

リゾホスファチジン酸による血管形成制御機構の解析

著者	雪浦 弘志
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第16343号
URL	http://hdl.handle.net/10097/61337

リゾホスファチジン酸による 血管形成制御機構の解析

東北大学大学院薬学研究科

生命薬科学専攻

雪浦弘志

目次

略語、略記号一覧	3
第一章：序論	6
第二章：ゼブラフィッシュを用いた血管形成における LPA 産生酵素 ATX の 機能解析と下流で機能する LPA 受容体の同定	
【はじめに】	16
【方法】	18
【結果】	23
【考察】	26
【図表】	28
第三章：ゼブラフィッシュを用いた血管形成における LPA 分解酵素 LPP3 の 機能解析	
【はじめに】	40
【方法】	42
【結果】	48
【考察】	52
【図表】	53

第四章：ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用いた LPA signal と LPP3 の
機能解析

【はじめに】	67
【方法】	68
【結果】	74
【考察】	80
【図表】	82

第五章：総括	106
--------	-----

References	109
------------	-----

発表論文	114
------	-----

謝辞	115
----	-----

略語、略記号一覧

ATX : autotaxin

BSA : bovine serum albumin

C1P : ceramide-1-phosphate

CAG promoter : cytomegarovirus enhancer/chicken β -action promoter

cDNA : complementary deoxyribonucleic acid

Cre : Cre recombinase

DG : diacylglycerol

E~ : embryonic day~

ENPP : ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase

FCS : fetal calf serum

GAPDH : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GPCR : G protein-coupled receptor

HUVEC : human umbilical vein endothelial cell

LC : liquid chromatography

LPA : lysophosphatidic acid

LPC : lysophosphatidylcholine

LPP : lipid phosphate phosphatase

lysoPLD : lysophosphatidylcholine

MG : monoacylglycerol

MO : morpholino oligonucleotide

MS : mass spectrometry

mRNA : messenger ribonucleic acid

PAF : platelet-activating factor

PBS : phosphate-buffered saline

PCR : polymerase chain reaction

PTX : pertussis toxin

S1P : sphingosine-1-phosphate

第一章：序論

第一章：序論

リゾホスファチジン酸 (LPA) は、グリセロール骨格に 1 本の脂肪酸とリン酸が結合した単純な構造のリゾリン脂質であるが、多彩な生理的・病的機能を有している (図 1-1)。

古くには LPA は、生体内でその存在が微量であったことからリン脂質の合成あるいは代謝の中間体という程度の認識であり、その作用も界面活性効果程度しか注目されていなかった。しかし、LPA が加温血漿中の昇圧物質であると報告がなされたのち(1)、様々な生理活性作用を有していることが次々と明らかになり、現在では血小板活性化因子 (PAF) やスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) などと共にリゾリン脂質メディエーターの 1 種に分類される (図 1-2)。

LPA がメディエーターとしての作用を引き起こすメカニズムは長い間不明であったが、1996 年に、胎生期の脳質に発現している遺伝子である *vzq-1* の産物が LPA をリガンドとする 7 回膜貫通型の G 蛋白質共役型受容体 (G-protein coupled receptor, GPCR) であることが報告された(2)。これを皮切りに LPA をリガンドとする受容体が次々と同定され、現在までに 6 つの LPA 受容体が報告されている。これらの受容体は同定された順に LPA₁(2)、LPA₂(3)、LPA₃(4)、LPA₄(5)、LPA₅(6)、LPA₆(7)と命名されている。LPA の機能について、その産生系を理解することも重要である。従来、LPA は血漿に少なく血清に多いことがわかっており、血液凝固の際に血小板が放出して出来る系が想定されていたが(8,9)、血小板からの LPA 産生だけでは説明が困難であると考えられていた(10)。一方、血漿中にはリゾホスファチジルコリン (lysophosphatidylcholine, LPC) に作用して LPA を産生する酵素活性の存在が確認されていたが (LPC の切断様式からリゾホスホリパーゼ D と呼ばれている)、その実体は長い間不明であった(11,12)。しかし、2002 年、当研究室では、ウシ胎仔血清からリゾホスホリパーゼ D を精

製・クローニングすることに成功し、リゾホスホリパーゼ D が癌細胞浸潤促進因子として知られていたオートタキシン (Autotaxin, ATX) と同一であることを明らかにした(13)。

ATX は 1992 年に、細胞運動促進活性を指標としてヒトメラノーマ細胞 A2058 の培養上清から精製された分子である(14)。一次配列の相同性から、ATX は ATP などの核酸のホスホジエステル結合を切断する ENPP (ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase) ファミリーに属する酵素であると予測された(15)。また、百日咳毒素 (Pertussis, PTX) で処理した細胞に対してはその活性を示さないこと(14)、活性中心のスレオニンアラニンに置換した変異体は細胞運動促進活性を示さないことなどから(16)、ATX の有する酵素活性により作られた産物が、PTX 感受性の GPCR に作用することで細胞運動促進活性が発揮されると考えられていた。しかし、当時同定されていた他の ENPP ファミリー分子と比較して核酸に対する ATX の酵素活性が非常に弱いことなどから、ATX の生体内での基質や産生物は不明なままであった。LPA 産生酵素リゾホスホリパーゼ D が ATX と同一であることが判明し、更に LPA 自体に様々な癌細胞株の運動性と増殖を促進する効果があることから、ATX は LPA を産生することで癌細胞の運動性を促進しているというメカニズムが想定されている (図 1-3)。

ATX は生体内において、正常組織(17)や精液・尿といった体液(18)、胚発生期の関節(19,20)、小腸粘膜下組織のマスト細胞(21)などに発現していることから、生理的に LPA を産生することで何らかの機能を担っている可能性がある。また ATX はさまざまな癌や、慢性肝疾患、特発性肺線維症、濾胞性リンパ腫、妊娠末期妊婦の血清で発現が上昇することが知られているが(22-24)、その生理的意義はまだ不明な点が残っている。

最近、当研究室において ATX ノックアウトマウスの解析がなされ、ATX ノックアウトマウスが胎生期 10.5 日目までに致死であることが明らかとなった(25)。

ATX ノックアウトマウスは血管形成に異常をきたすことから、胎生期において ATX が血管形成に関与しているという可能性が示唆されている。また、ATX の活性中心に変異を入れ、ATX を不活性化したノックインマウスが作製されたが、このマウスも ATX ノックアウトマウスと同様の表現型を示し致死であることから、ATX のリゾホスホリパーゼ D 活性により産生される LPA が血管形成に重要な働きをしていることが考えられる(26)。

しかしながら、現在までに LPA₁ から LPA₆ 受容体の単独ノックアウトマウスが作製されているが ATX ノックアウトマウスと同様な血管異常を示すマウスはおらず、LPA がどの受容体を介して血管形成を制御しているのかはわかっていない(27)。

最近、当研究室において ATX 過剰発現マウスが ATX ノックアウトマウスと同様に、血管形成異常を示し胎生致死であることが明らかとなった。このことから生体内の LPA 量が全くない場合、過剰にある場合のどちらとも適切な血管形成が出来ないことがわかる。興味深いことに *in vitro* で LPA 分解活性を有することが報告されている Lipid phosphate phosphatase 3 (LPP3) のノックアウトマウスも ATX 過剰発現マウスと同様の表現型を示すことから、生体内で LPP3 が LPA 量を適切に制御し、血管形成を制御していることが示唆される。

以上の背景をふまえ、私は LPA 産生酵素、受容体、分解酵素の網羅的な解析から、血管形成における LPA の詳細な機能を探ろうと考えた。そこで、詳細に血管形成を観察でき、さらに簡便に複数の遺伝子の機能を抑制できるモデル動物として、ゼブラフィッシュを用いることとした。ゼブラフィッシュを用いる利点としては以下の4つが挙げられる。

① ATX、LPA 受容体、さらには LPA 前駆体産生酵素、LPA 分解酵素の候補遺

伝子がすべて保存されている。

② 体が透明であり、血管特異的に GFP を発現するゼブラフィッシュを用いると生きたまま血管構造を観察できる (図 1-4)。

③ モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) あるいは mRNA をゼブラフィッシュ受精卵に投与することで、全身で遺伝子発現の抑制あるいは過剰発現が可能である (図 1-5)。

④ 複数の MO を用いることで複数遺伝子の同時抑制が可能という特徴を有する。

今回の研究では、まず、ゼブラフィッシュを用いて血管形成における ATX の機能解析を行い、さらに血管形成に寄与する LPA 受容体の同定を行った【第二章】。次にゼブラフィッシュを用いて LPA 分解酵素である LPP3 の機能解析を行った【第三章】。LPA 受容体、LPP3 は内皮細胞に発現していることがわかったので、ヒト内皮細胞である human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)を用いて LPA signal と LPP3 の細胞レベルでの機能を解析した【第四章】。

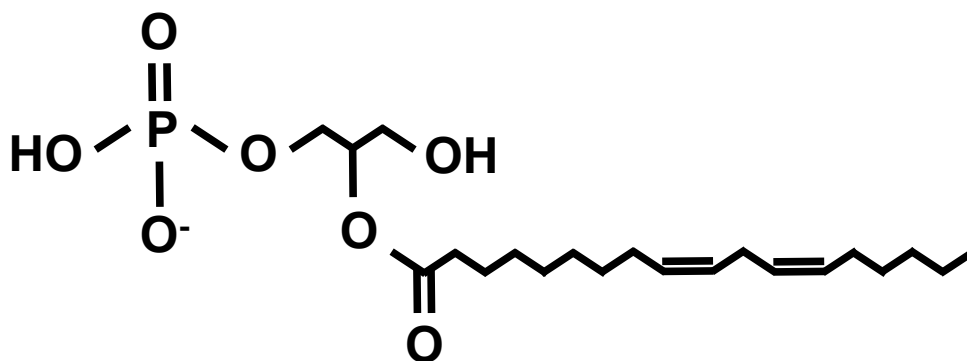


図 1-1. リゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid, LPA) の構造

Lysophosphatidic acid (LPA) はグリセロール骨格にリン酸基と一本の脂肪酸が結合した単純なリン脂質である。

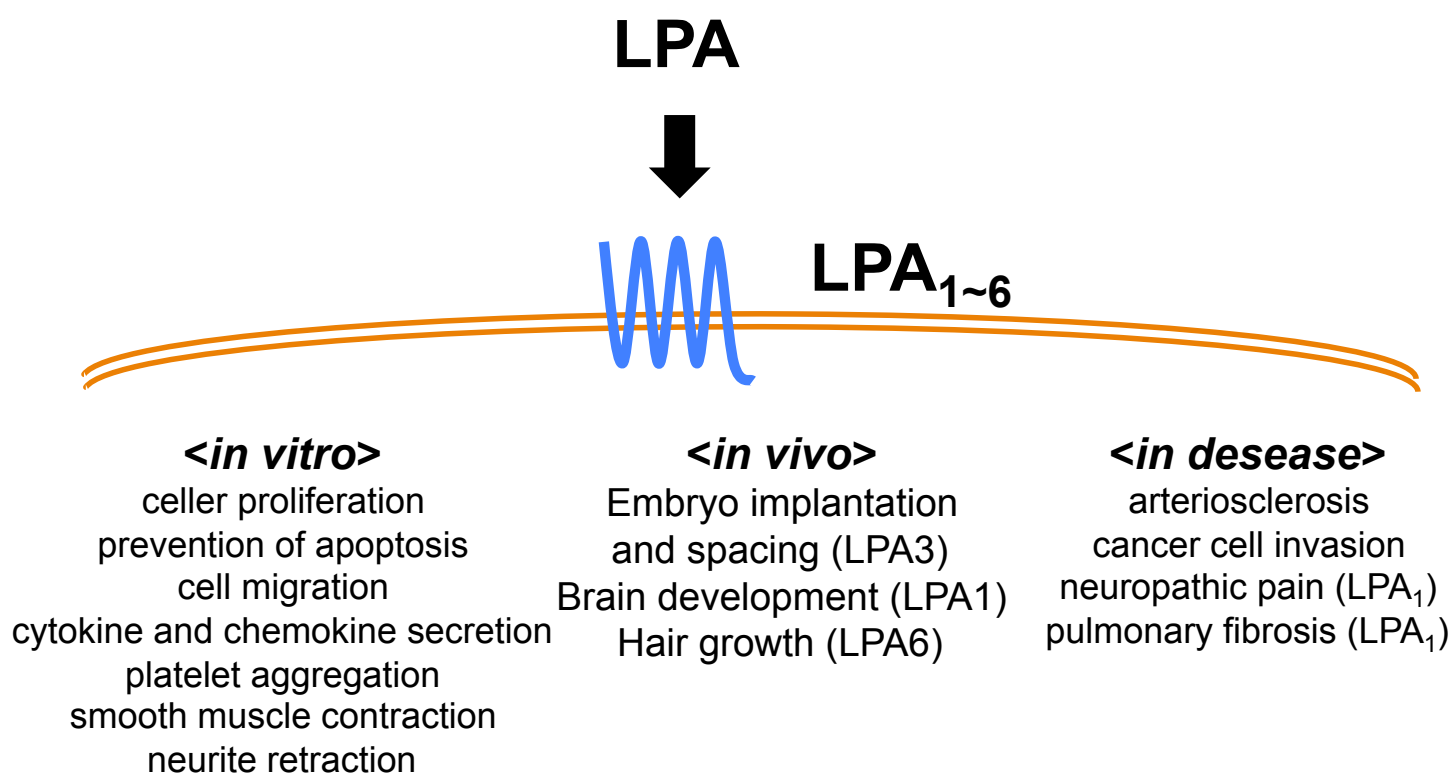
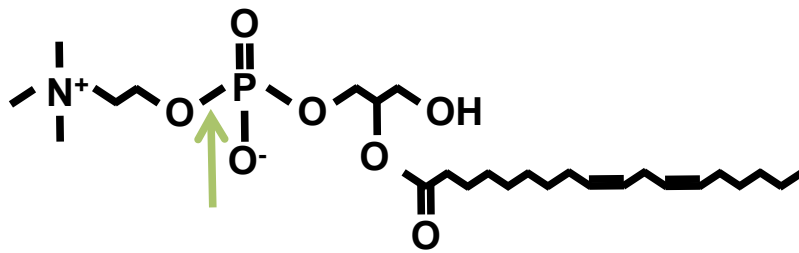


図 1-2. LPAの機能

LPAの作用はGタンパク質共役型受容体を介して発揮され、これまでにLPA₁-LPA₆の6つの受容体が同定されている。*In vitro*, *in vivo* においてLPAはさまざまな生理活性を示す。



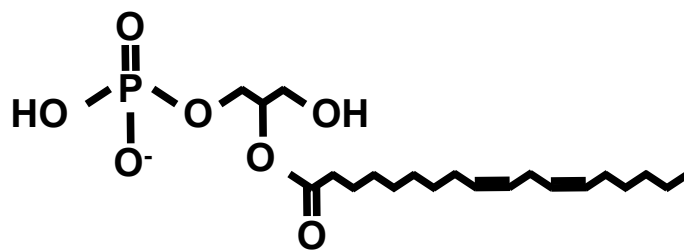
Lysophosphatidylcholine (LPC)



リゾホスホリパーゼ D

||

オートタキシン (Autotaxin, ATX)

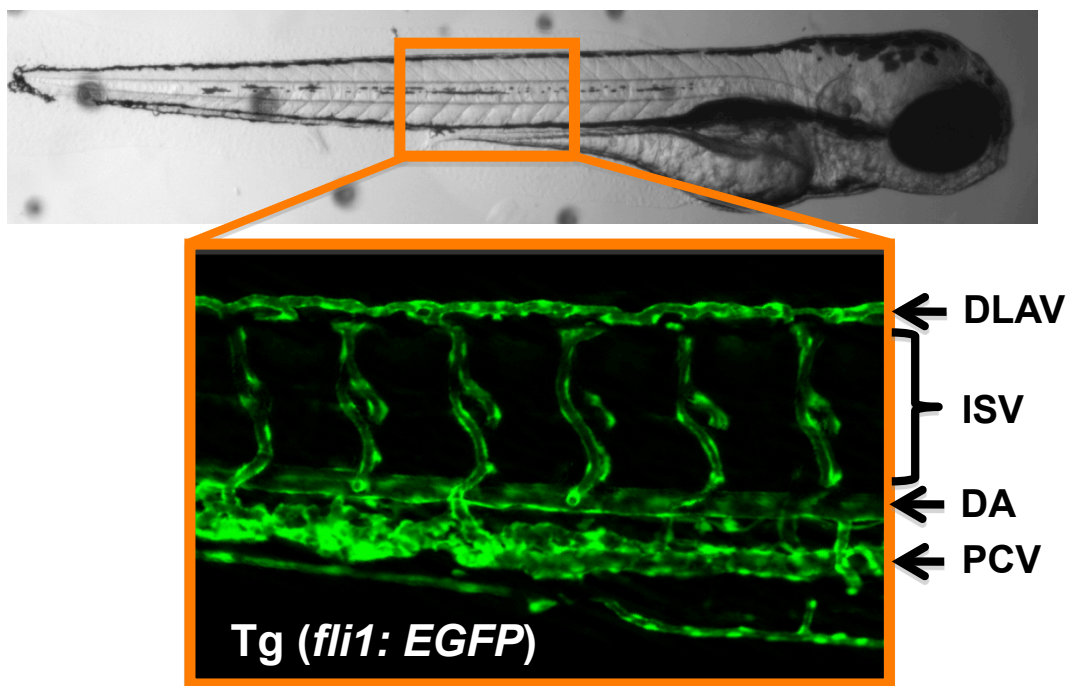


Lysophosphatidic acid (LPA)

図 1-3. LPA産生酵素オートタキシン(ATX)

血中LPA産生酵素リゾホスホリパーゼDの精製・クローニングの結果、リゾホスホリパーゼ Dが癌遊走因子として知られていたオートタキシン(ATX)と同一であることがわかった。

ATXはさまざまな癌組織で高発現しているほか、正常組織に置いても広範に発現が認められる。



DLAV: dorsal longitudinal anastomotic vessel

DA: dorsal aorta

ISV: intersegmental vessel

PCV: posterior cardinal vein

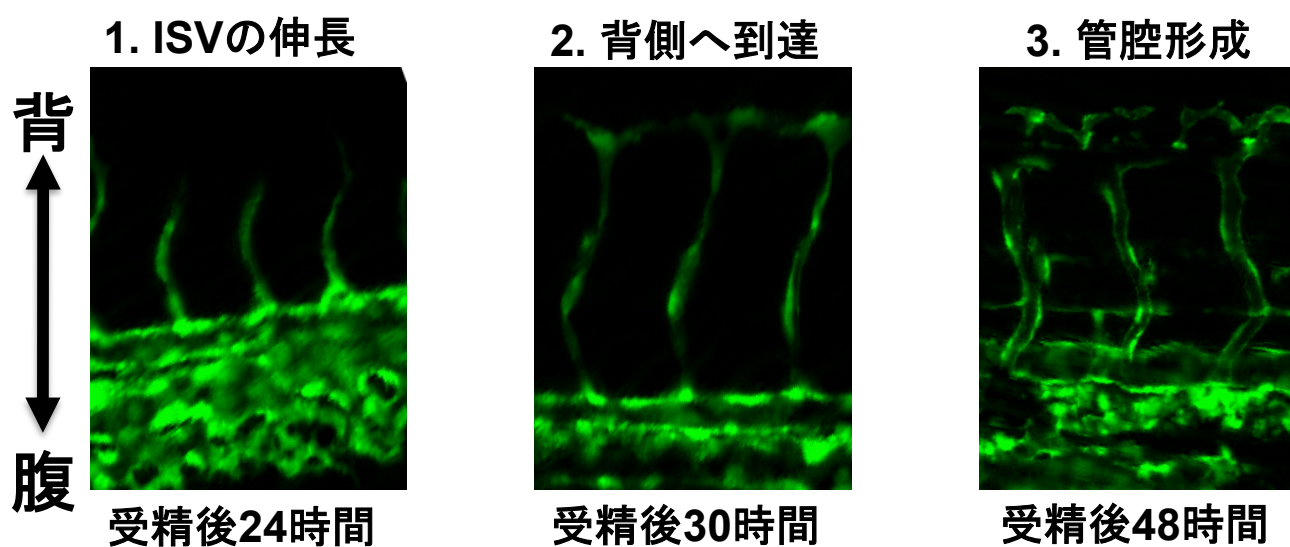
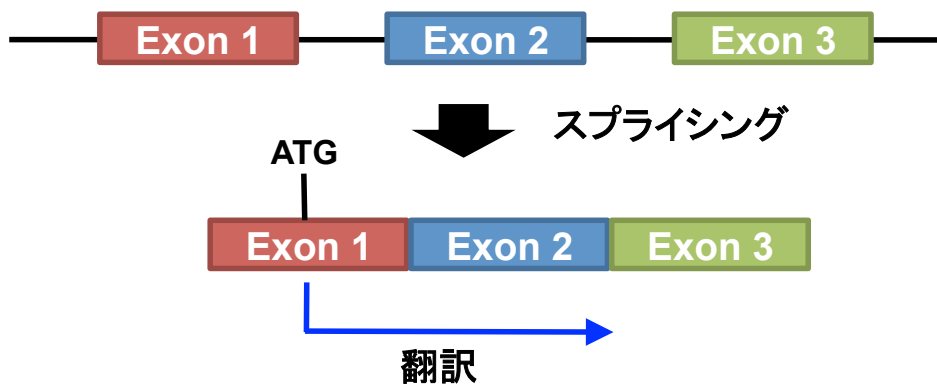
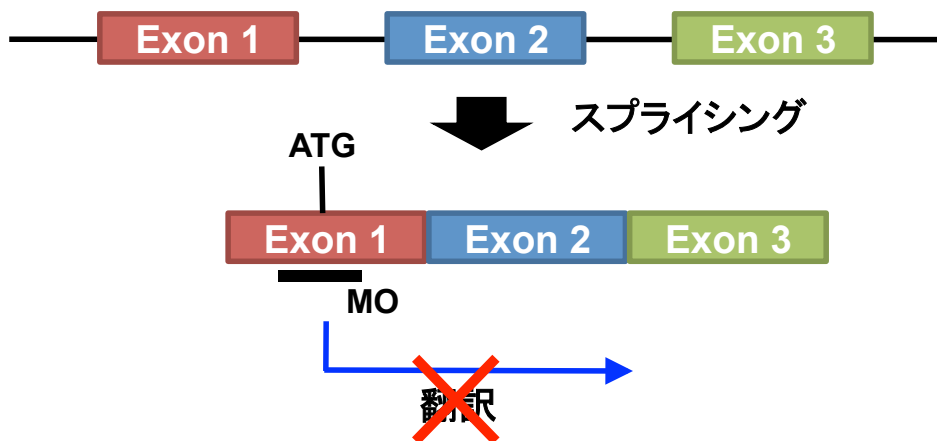


図 1-4. ゼブラフィッシュは血管形成観察が容易である。

通常時



翻訳阻害型 MO



スプライス阻害型 MO

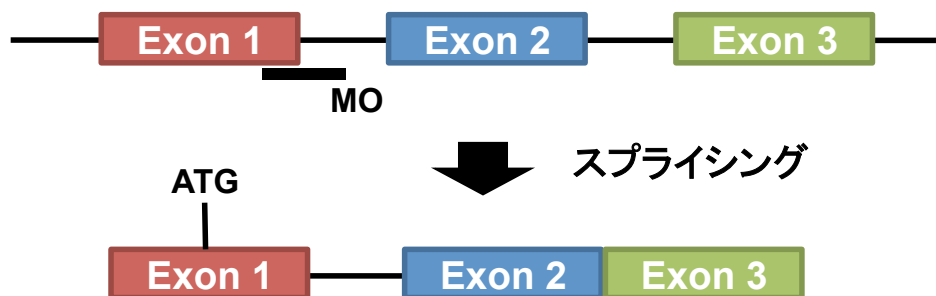


図 1-5. モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) による遺伝子ノックダウンの原理

翻訳阻害型MOは、mRNAの翻訳が開始されるATGの周辺部位に対して相補的な配列になるように作製することで、翻訳を阻害することができる。スプライス阻害型MOはExon-Intron間の配列に相補的になるように作製することで、スプライスを阻害することでmRNAの成熟を阻害することができる。

第二章：

ゼブラフィッシュを用いた血管形成に
おける LPA 産生酵素 ATX の機能解析と
下流で機能する LPA 受容体の同定

第二章：ゼブラフィッシュを用いた血管形成における LPA 産生酵素 ATX の機能解析と下流で機能する LPA 受容体の同定

【はじめに】

現在、LPA の主要な産生酵素である ATX は血管形成に重要な因子であることが認められている。ATX が血管形成に関与していることは 2001 年に初めて示された。精製した ATX をマトリゲルに入れマウスに注入したところ、マトリゲル単独よりも血管形成が促進されていた。また血管内皮細胞(HUVEC)を用いた実験でも ATX がマトリゲル中の HUVEC の管形成を促進することがわかった(28)。

2002 年に ATX KO マウスが作製され、ATX KO マウスが血管形成異常を示し、致死であることから生体内でも ATX が血管形成に関して重要な分子であることが明らかとなっている (図 2-1)。ATX KO マウスの血管を LacZ や PECAM の免疫染色で可視化した結果、血管の並びが不規則であり、羊膜上の血管の管腔が出来ていないことがわかった(25)。

しかし ATX とその産生物である LPA がどのように血管形成に関与しているかの詳細なメカニズムはわかっていない。その原因の一つとして ATX の下流で働くであろう LPA 受容体のノックアウトマウスで ATX ノックアウトマウスと同じような血管形成異常を示すものがないということがある。現在までに LPA₁₋₆ のノックアウトマウスが作製されており、ATX KO マウスとは異なり生存可能であることが明らかになっている。LPA₄ については最近、胎生期の血管とリンパ管形成を制御していることが報告されたが、LPA₄ の血管における表現型は周皮細胞や平滑筋細胞が血管内皮細胞の周囲に動員されないことによって生じるもので、ATX KO で見られる表現型とは異なっている(29)。以上のように LPA 受容体単独ノックアウトでは致死的な血管形成異常が生じないことから、

血管形成には複数の受容体が関与しておりお互いにリダンダンシーを有して機能している可能性が示唆される。

そこで今回はゼブラフィッシュを用いて、血管形成における LPA の機能を詳細に解析するとともに、血管形成に関与する LPA 受容体の同定を試みた。

【方法】

特に記載のない試薬は和光純薬工業より購入した。

1. 実験動物（ゼブラフィッシュの維持）

AB line（野生型）と Tg (*fli1*: EGFP) line は ZIRC から入手した。血管形成の観察には Tg (*fli1*: EGFP) を使用し、それ以外は AB line を用いて実験を行った。ゼブラフィッシュは水温 28°C、10:30 点灯、24:00 消灯の明暗周期にて飼育した。掛け合わせは、実験前日の 20:00~24:00 に 1L タンクに仕切りを入れ、それぞれにオスとメスを 2 匹ずつ入れた。点灯後、速やかに仕切りを取り除き、自然産卵にて受精卵を回収した。受精卵は水温 28°C、embryo medium E2（15.0 mM NaCl, 0.5mM KCl, 1.0 mM MgSO₄, 0.15 mM KH₂PO₄, 0.05 mM Na₂HPO₄, 1.0 mM CaCl₂, 0.7 mM NaHCO₃）中で飼育した。

2. MO 設計

MO は CDS（タンパク質のコーディング領域）が 2 つ以上の exon に股がっている遺伝子に関してはスプライシング阻害型 MO、CDS が 1 つの exon で構成されているものに関しては翻訳阻害型 MO を Gene Tools 社に依頼して作成した。スプライシング阻害型 MO は PCR によって標的遺伝子の正常なスプライシングが阻害されていることを確認した。翻訳阻害型 MO は MO ターゲット配列の下流に GFP 遺伝子がコードされている mRNA を作製し、その mRNA の翻訳が阻害されることを確認した。使用したプライマーの配列は表 1 に示した。

3. mRNA と *in situ* hybridization 用プローブの合成

mRNA またはプローブの合成用にクローニングしたもの（pCS2, pCS2P, pCS2P+ベクターにクローニングしたもの）を適切な制限酵素によって直線化し、

等量の proteinase K 溶液 (0.4mg/ml proteinase K (Roche) , 0.2 mM Tris pH 7.5, 25 mM EDTA, 0.3 M NaCl, 2% SDS) を加えて 50℃で 30 分間反応させ、フェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈殿により直線化したプラスミドを精製した。mRNA の合成は mMESSAGE mMACINE kit (Ambion)を用いてマニュアルに従って SP6 プロモーターから行った。プローブの合成は 1 µg DNA に対して、1 µl T7 あるいは SP6 RNA polymerase (Roche)、2 µl 10×Transcription buffer (polymerase を購入した時に付属してあるもの)、1 µl RNase inhibitor (Promega)、2 µl 10×DIG RNA-labeling Mix (roche)、nuclease-free water をトータル 20ul になるように加えた。37℃で 2 時間反応させた後、2 µl Dnase (Roche) を加え、さらに 37℃, 15 分間反応させた。mRNA とプローブの精製は NucleoSEQ Columns (MACHEREY-NAGEL) を用いた。

4. MO インジェクション (細胞内投与)

MO は目的濃度に 0.2 %フェノールレッド溶液に希釈した。インジェクション用のマイクロピペットはガラス管 (NARISHIGE, GD-1) をプーラー (NARISHIGE, PC-10) により引き伸ばし作成した。マイクロピペットに MO をアプライし、実体顕微鏡下で電動マイクロインジェクター (NARISHIGE, IM-31) を用いて 1-4 細胞期のゼブラフィッシュの yolk に 1~4 nl 投与した。

使用した MO の配列を以下に示す。

ATX MO1, 5- GGAGAATACCTGGGTCGAGACACCG-3 ;

ATX 5-mismatch MO1, 5- GGAcAATAgCTGcGTCcAGACAgCG-3;

ATX MO2, 5- TTCTTTCAAAGTCCCTACCTTTGCA-3;

LPA₁ MO, 5- TGGAGCACTTACCCAATACAATCAC-3

LPA_{2a} MO, 5- CCAGCCCTAAAACACAGGAAGACAT-3;

LPA_{2b} MO, 5- CTGATCTACAAGGAGAATATCACAC-3;

LPA₃ MO, 5- ATGTAAAGCAGTAATCTCACCTAGC-3;
LPA₄ MO1, 5- GGCCATTTTGGCACTTGCAGTAGAT-3;
LPA₄ MO2, 5- ACTCCTGTTTCCAGTTAATTTCCGA-3;
LPA_{5a} MO, 5- TCCAAAGAGACTGGTGTGTTTAAGA-3;
LPA_{5b} MO, 5- TTCTCTCAAGAAAACGAATCGACGT-3;
LPA_{6a} MO, 5- TCTTAACAACAGACAAAGGCACGCT-3;
LPA_{6b} MO, 5- TTTGGCTTAAAACACAGTGAGTGTA-3.

5. ウェスタンブロッティング

受精後 48 時間後のゼブラフィッシュ 30 匹を 1.5 mL チューブに入れ、そこに deysolking buffer (55 mM NaCl, 1.8 mM KCl, 1.25 mM NaHCO₃) を加え、P200 黄色チップ(739296, Greiner Bio-one) でサスペンドすることでゼブラフィッシュの yolk 部分を除去した。次に室温で 5 分間 direct mixer (DM-301, AS ONE Corp.) でシェイクした。30 秒間 300g で遠心し、上清を除去した。1 ml の wash buffer (110 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 2.7 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 8.5) を加え、数回サスペンドし、30 秒間 300 g で遠心し、上清を除去したところに Laemmli sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 % (v/v) glycerol, 2 % (w/v) SDS, 0.002 % (w/v) bromophenol blue, and 5 % (v/v) mercaptoethanol) を加え、溶解後、5 分間 boil させ spin down した。定法に従い、SDS-PAGE を行いニトロセルロース膜に 4°C, 280 mA で 120 分間トランスファーし、5 % (w/v) スキムミルク-TTBS (10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 150 mM NaCl, 0.05 % (v/v) Tween 20) で 1 時間ブロッキングを行った。抗体はすべてブロッキングに使用した 5%スキムミルク-TTBS に希釈して使用した。rat anti-zebrafish atx 抗体 (当研究室により作製されたものを使用) を添加し 4°Cで一晩震盪した。TTBS で洗浄し (5 分間×3 回)、続いて HRP 標識 anti-rat IgG 抗体を添加し室温にて 1 時間震盪した後、TTBS で

洗い (5 分間×3 回)、ECL 発色を行った。

6. 血管形成評価

Tg (*fli1:EGFP*) を交配させ、生まれた 1-4 細胞期の受精卵に各 MO をインジェクションした。ゼブラフィッシュの色素形成を阻害するため、受精後 24 時間時点で、メラニン合成阻害剤である phenyl-thiourea (PTU) を含有する medium に置換した。受精後 48 時間のゼブラフィッシュを 麻酔+PTU 含有の 0.7% 低融点アガロース (0.01% Tricaine, 0.003% PTU.) に埋め、観察した。またタイムラプス撮影の場合は、温度を 28 °C に保ち、受精後 30-42 時間の間を二時間おきに撮影した。観察には LSM 700 confocal laser-scanning microscope (Carl Zeiss) を使用した。

7. Whole mount *in situ* hybridization (*atx*)

受精後 30 時間後のゼブラフィッシュ胚を用い、常法にて行った(30)。4 % PFA-PBS で 4 時間固定し (室温)、その後メタノールで脱水し、-20 °C で保存した。75%, 50%, 25% MeOH/PBS に 5 分間ずつ浸して再水和を行った後、PBT (PBS, 0.1% Tween 20) で 5 分ずつ 3 回洗浄を行い、Proteinase K を用いて透過処理を行い、その後 4 % PFA-PBS で 20 分間再固定を行ったのち、PBT で 5 分ずつ 3 回洗浄した。サンプルを hybridization mix (50% formamide, 5 x SSC (20 x SSC stock solution: 175.3 g of NaCl and 88.2g of Citric acid trisodium salt を 1 L の MQ に溶解), 0.1% Tween 20, 50 mg/ml heparin, 500 mg/ml RNase-free tRNA adjusted to pH 6.0 by adding citric acid (460 ml of 1M citric acid solution for 50 ml of hybridization mix)) 中へと移し、70°C で 2-3 時間 プレハイブリダイゼーションを行った。プレハイブリダイゼーション後ハイブリダイゼーションに全長のジゴキシゲニンラベルプローブを用いた。70 °C で 12 時間ハイブリダイゼーショ

ンを行った後、洗浄するため、75%, 50%, 25% hybridization mix/2 x SSC で各 15 分ずつ 70℃で浸していった。2 x SSC で 15 分間 70℃で洗浄し、さらに 0.2 x SSC で 30 分間ずつ 70℃で 2 回洗浄を行った。その後、75%, 50%, 25% 0.2 x SSC/PBT で各 5 分間ずつ室温で浸していき、最後に PBT で 5 分間洗浄した。Blocking Buffer (Roche) に 1 時間以上室温で浸し、AP 標識抗ジゴキシゲニン抗体溶液に入れ替えて、4℃で overnight 反応させた。PBT で 15 分間ずつ 6 回洗浄し、さらに AP buffer (100 mM Tris HCl, pH 9.5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl and 0.1% Tween 20) で各 5 分間ずつ 3 回洗浄した。その後、BCIP/NBP 溶液 [5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium] に浸し、実体顕微鏡で確認しながら発色させた。PBS (pH 5.0) で洗浄し、発色反応を停止させ観察した。

【結果】

1. ゼブラフィッシュでも ATX をノックダウンすることにより血管形成異常を生じる

血管形成における LPA の機能を探るために、産生酵素である ATX を、MO を用いてノックダウンし、血管形成を観察することにした。ATX に対するスプライス阻害型 MO を二種類 (ATX MO1, ATX MO2) とコントロールとして ATX MO1 の配列から 5 塩基変異させた配列の MO (ATX 5-mis MO) を作製した (図 2-2 A)。ATX MO を投与したゼブラフィッシュ (受精後 48 時間) から mRNA を抽出し、逆転写した後、PCR 反応を行い、ATX MO 投与により異常な mRNA ができていることを確認した。この mRNA のシーケンスを確認したところ ATX MO1 投与では Exon2 が欠失しており、ATX MO2 投与では Exon4 の後半 14bp が欠失していることがわかった (図 2-2 B, C)。さらにタンパク質レベルで ATX の減少を見るため、ATX MO を投与したゼブラフィッシュ胚 (受精後 30 時間) からタンパク質を抽出し、抗ゼブラフィッシュ ATX 抗体 (当研究室において作製された) を用いてウェスタンブロット行ったら、ATX MO 投与により ATX タンパクの発現が減少していることがわかった (図 2-2 D)。

ATX MO により、ATX がノックダウンされていることがわかったので、次に血管形成を観察した。まずゼブラフィッシュの血管形成過程を説明する。24 hour post fertilization (hpf, 受精後~時間) で、Dorsal aorta (DA, 動脈) から Intersegmental vessel (ISV) と呼ばれる血管が出芽している様子が観察される。さらに 30 hpf に ISV が背側に到達し、Dorsal Longitudinal Anastomotic Vessel (DLAV) を形成する。48 hpf には血管の管腔構造が出来上がる (序論: 図 1-4)。ATX MO 投与胚は 48 hpf では ISV が伸長の途中で横の ISV と結合してしまう様子が観察された (図 2-3 A)。この途中で横の ISV と結合してしまう異常を定量したところ、コント

ロール胚ではこの異常がほとんど見られないのに対し、ATX MO 投与胚では約 50-60%の個体で異常が見られた (図 2-3 B, C)。血管形成過程をタイムラプス撮影し、経時的に観察した結果、ATX MO 投与胚では ISV の伸長が遅れ、最終的に横に伸びてしまい、隣の ISV と結合してしまっていることがわかった (図 2-4)。

2. ATX は主に神経管と血管に発現している

Whole mount *in situ* hybridization 法を用いて ATX mRNA の発現部位を調べた。結果、30 hpf では ATX は主に頭部、神経管、血管に発現していることがわかった (図 2-5)。

3. LPA₁, LPA₄ を同時にノックダウンすると ATX ノックダウン時と同様の血管形成異常を示す

次に ATX による血管形成に関わる LPA 受容体の同定を試みた。データベース検索した結果、ゼブラフィッシュには LPA₂, LPA₅, LPA₆ が 2 つずつ存在していたため、それぞれを a, b と区別している。まず重複しているものを含めて 9 つの LPA 受容体に対して MO を作製し、効果確認を行った。LPA₁, LPA_{2a}, LPA_{2b}, LPA₃ に対してはスプライス阻害型 MO を使用し、全ての MO で異常な mRNA の存在が確認できた (図 2-6)。LPA₄, LPA_{5a}, LPA_{5b}, LPA_{6a}, LPA_{6b} に対しては翻訳阻害型 MO を作製し、実際に MO ターゲット配列の下流に EGFP 遺伝子をコードした mRNA の翻訳を阻害することが確認できた (図 2-7)。次に各 LPA 受容体をノックダウンし血管形成を観察したところ、ATX をノックダウンした際に見られるような血管異常を示す個体はいなかった。そこで各 LPA 受容体をさまざまな組み合わせで同時にノックダウンし、血管形成を観察すると、LPA₁ と LPA₄ を同時にノックダウンした場合 ATX ノックダウン時に見られる血管異常と類似した表現型を示した (図 2-8, 9)。さらに LPA₄ をノックダウンした胚を

LPA₁₋₃ の阻害剤である Ki16425 を含んだ飼育液で育てた場合も、同様の血管形成異常を示した (図 2-8, 9)。また興味深いことに LPA_{6a} と LPA_{6b} を同時にノックダウンすると血管の異常な分岐が見られた。このことから LPA₆ も血管形成に関与していると考えられる。このことから ATX ノックダウンによる表現型は、LPA₁, LPA₄, LPA₆ にシグナルが入らなくなったせいだと考えられた。次に LPA₁, LPA₄, LPA_{6a}, LPA_{6b} を同時にノックダウンしようと試みたが、MO を多くインジェクションしたため発生過程に非特異的な影響が強く出てしまい、解析を行うことができなかった。

4. ATX または LPA₁/LPA₄ をノックダウンしても ISV を構成する細胞数に変化はない

ATX または LPA₁/LPA₄ をノックダウンした場合、ISV の伸長が止まることが明らかとなった。この異常の原因として、細胞の遊走異常や細胞の増殖抑制・アポトーシスなどが考えられる。そこで ISV を構成している内皮細胞の数を数えるため内皮細胞で核移行型 EGFP を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ (*fli1: nEGFP*) を用いて解析を行った。結果、コントロール胚も ATX または LPA₁/LPA₄ ノックダウン胚でも ISV を構成する細胞数は 2-3 個で変化はなかった (図 2-10)。この結果から、ATX-LPA シグナルは内皮細胞の増殖やアポトーシスに影響を与えていないことがわかった。

【考察】

今回の研究から、ゼブラフィッシュでも ATX が血管形成に重要であり、ATX が制御する血管形成には LPA₁, LPA₄, LPA₆ 受容体が関与することが明らかになった。さらに ATX ノックダウンによる血管形成異常は血管の伸長が止まることが原因であることが明らかとなった。しかし ISV を構成する細胞数は変化がなかったことからおそらく ATX は内皮細胞の動きを制御している可能性が高いと考えている (図 2-10)。それを示唆するデータとして、*in vitro* で ATX がヒト血管内皮細胞を遊走させる活性を有していることが報告されている(31)。さらにゼブラフィッシュの血管に LPA₁ が発現していること(32), マウスの血管内皮細胞で LPA₄ が発現していることが報告されている(29)。さらに、LPA₆ は様々な内皮細胞で高発現していることも知られている(33)。このことから ATX は LPA を産生し、その LPA が LPA₁, LPA₄, LPA₆ の 3 つの受容体を介して血管内皮細胞の動きを制御している可能性を考えている。

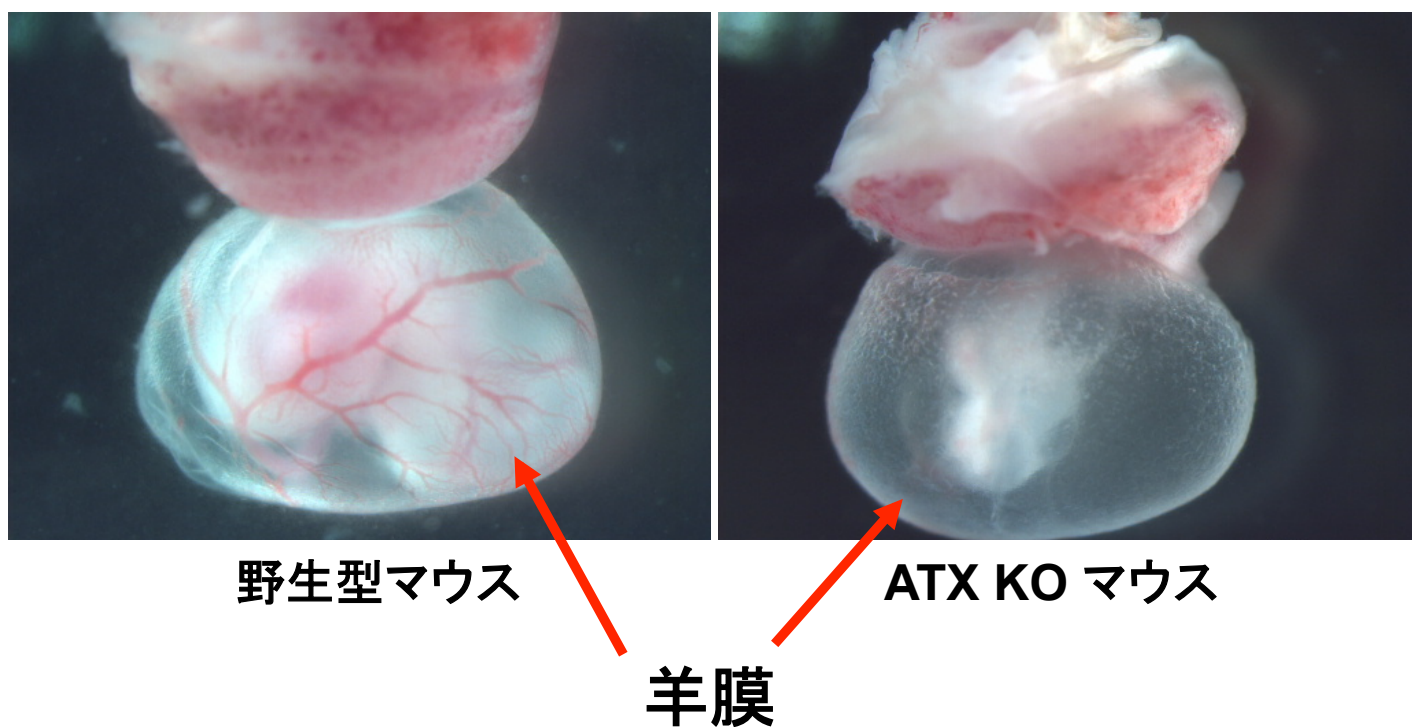
また今回ゼブラフィッシュにおいて ATX は主に頭部、神経管、血管に発現していることがわかった (図 2-5)。どこに発現している ATX が血管形成に重要であるかは今回の研究ではまだわかっていない。マウスでは ATX を組織特異的にノックアウトする研究が行われており、血管内皮細胞特異的 (Tie1 promoter - Cre) に ATX をノックアウトした場合は目立った異常は見られないことが報告されているので、内皮細胞が発現している ATX は血管形成において寄与があまりないと考えている(34)。この知見から神経管に発現している ATX が血管形成に重要である可能性が高いと考えている。実際に ISV の伸長が止まってしまう部分がちょうど神経管付近であることも、この可能性を示唆するデータである (図 2-3, 5)。

今後は、このゼブラフィッシュにおける ATX ノックダウンによる血管異常の

メカニズムがマウスにも当てはまるかどうかを調べる必要がある。当研究室には LPA_1 , LPA_4 , LPA_6 のノックアウトマウスが存在しており、現在ダブルノックアウトマウスまたはトリプルノックアウトマウス作製のため、交配を行っている。

	forward primer	forward primer
LPA ₁ MO	GCGAGTGATTTCTGGACCTTTCAGC	GCCTTTTTTACAGTCTCTTCTTGCG
LPA _{2a} MO	CCAGATGAAGAGCGTTTCC	CAGGGAGAAATGGTTTTTCCATC
LPA _{2b} MO	TGAGACTCGATTCCCTGAG	GACGACGGTCTTCATCAG
LPA ₃ MO 1st	ATGGAGAGTGAACCGAGAAC	CGGGGTACCTCAGGACTTGAGCATCT
LPA ₃ MO 2nd	ATGGAGAGTGAACCGAGAAC	ATGGGGTTCATGACGGAGTTG
ATX MO 1 1st	GTGCCGAGGTTTGAGTAG	ACAGTGGTCATCAAAGTCTG
ATX MO 1 2nd	TCGTTTCAGTGTGGAAGAGAG	ACAGGTTGTCACAGCGAC
ATX MO 2 1st	AGTAGTCGTTTCAGTGTGGAAGAGAG	TCAGGATAAAGCCCCGTTG
ATX MO 2 2nd	TCCGTTATGTGGCTTTTCTCA	ACCGTGCCTCCTCTTTTCA

表 1.
使用したプライマーの配列



Tanaka, M. et al. (2006) *J. Biol. Chem.*

図 2-1. ATX KOマウスの表現型

ATX KOマウスは血管形成異常を伴い胎生致死である。野生型マウスは羊膜上に血管が観察されるのに対し、ATX KOマウスは血管が観察されない。

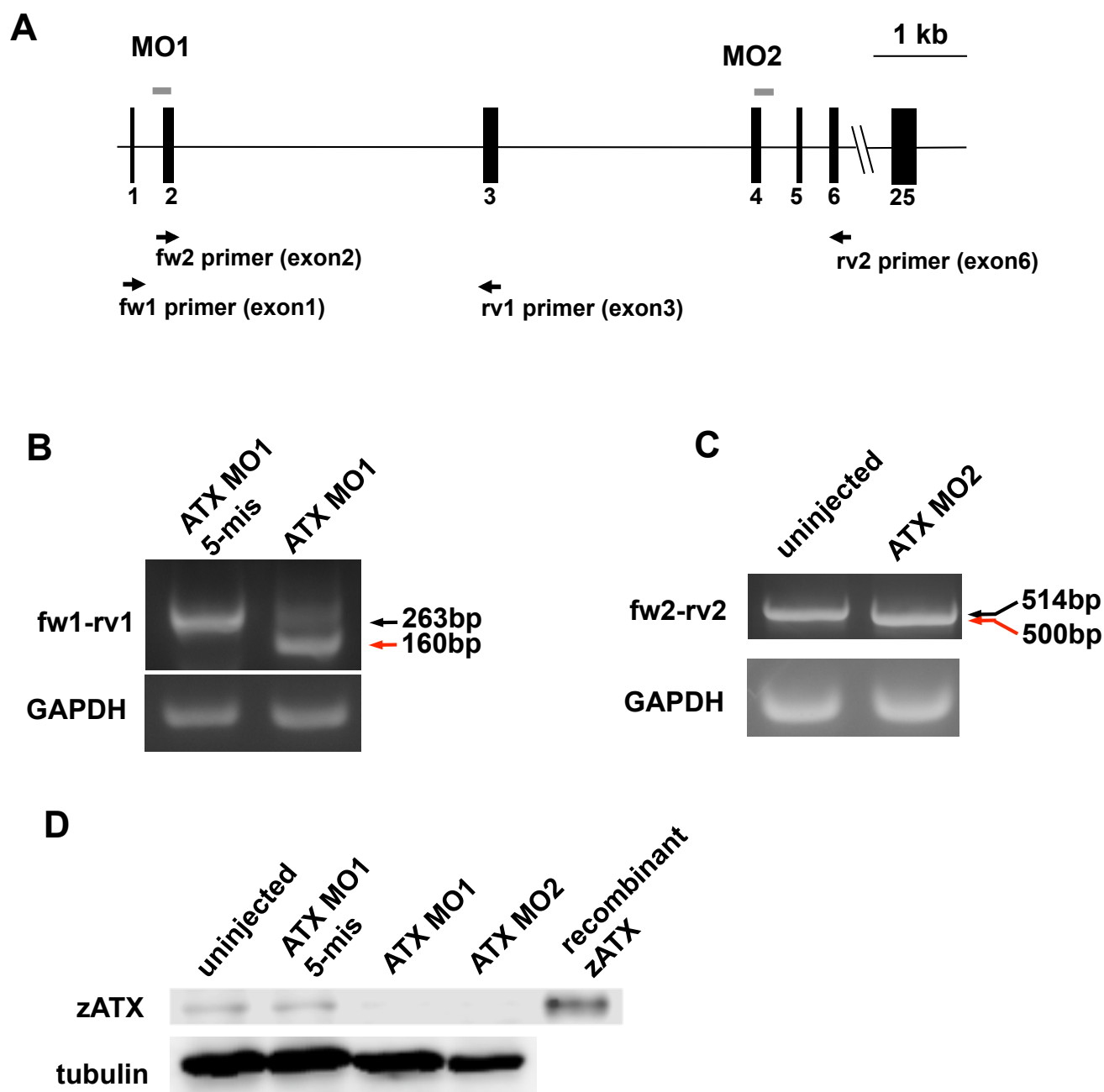
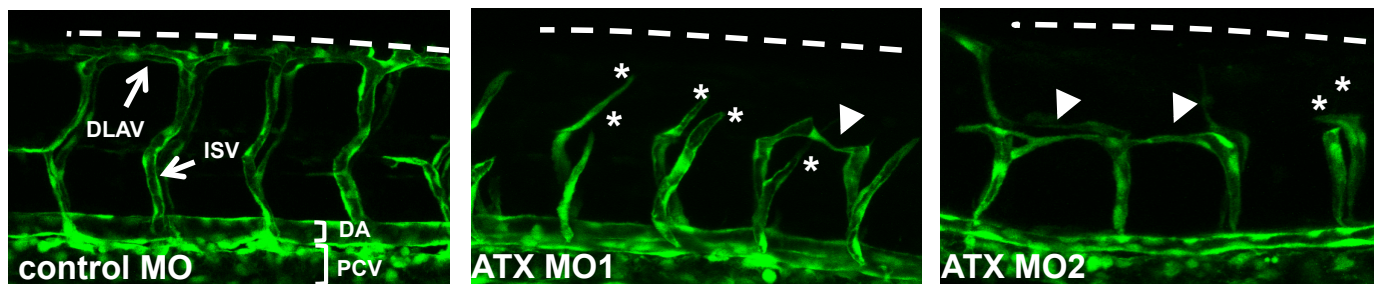


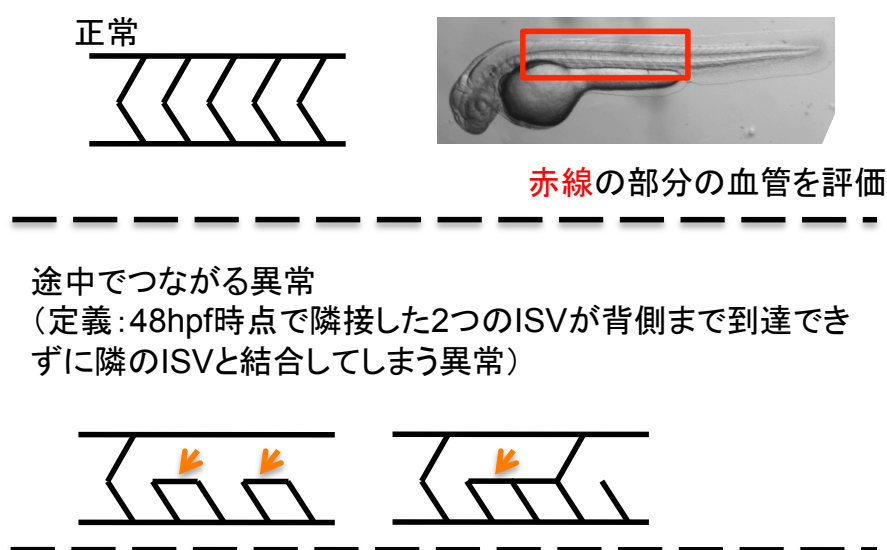
図 2-2. ATX MOの効果確認

- (A) ATX MO1はIntronとExon2の境界に、ATX MO2はExon4とIntronの境界の配列と相補的になるように作製した。
- (B,C) ATX MOを投与したゼブラフィッシュ胚からmRNAを抽出し、逆転写後、PCRを行った。
- (D) ATX MOを投与したゼブラフィッシュ胚からタンパクを抽出し、抗zebrafish ATX抗体を用いて、ウエスタンブロッティングを行った。

A



B



C

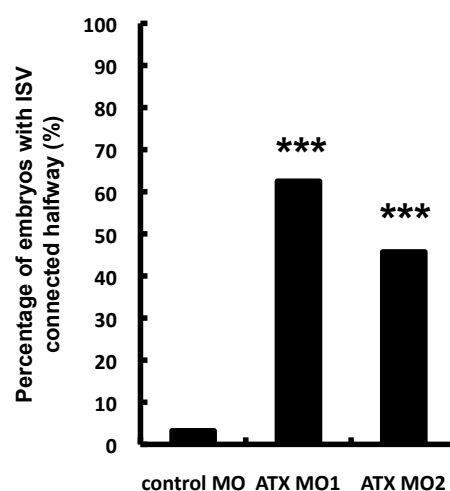


図 2-3. ATX MOによる血管形成異常 (48 hpf)

(A) 48 hpfでの血管形成。control MOに比べ、ATX MO投与胚ではISVが背側まで到着せず(*)、隣のISVと結合している(▼)。

(B) 血管形成異常を評価する際の評価基準

(C) ATX MO投与による血管形成異常を示す個体の割合
点線は背の部分を示している。

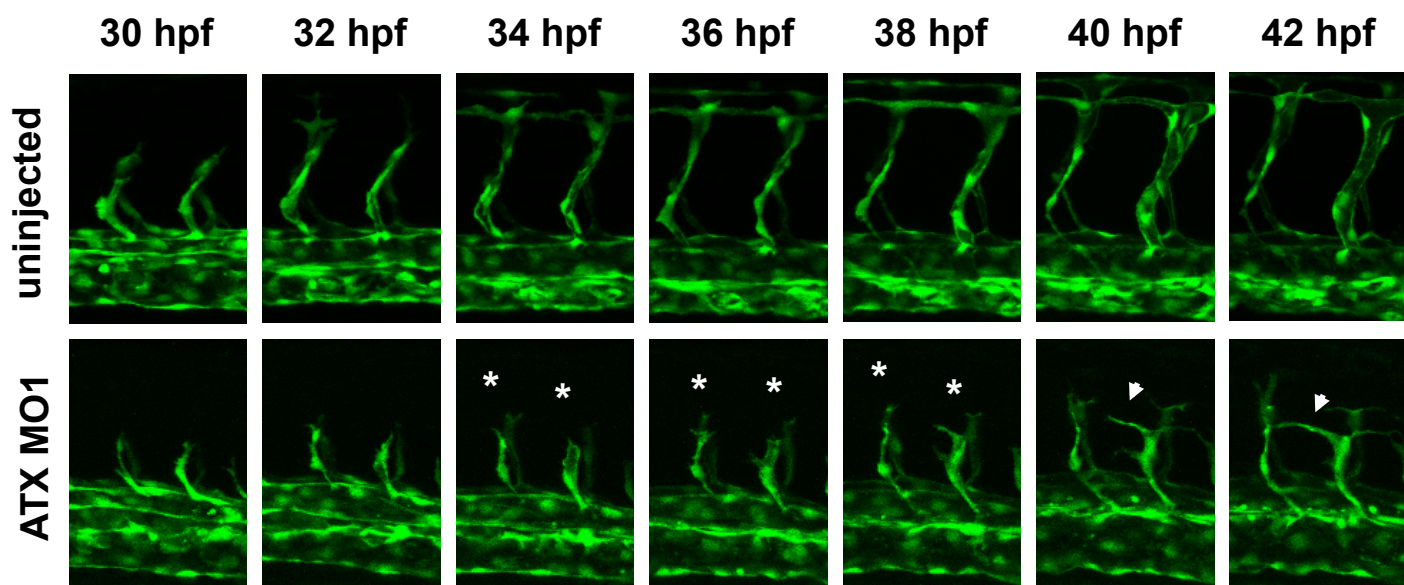


図 2-4. ATX MOによる血管形成異常(タイムラプス)

30-42 hpf の間に二時間ごとに経時的に撮影した。ATX MO投与胚では ISVが背側まで到達せず(*), 途中で横に伸び隣のISVと結合する様子(▼)が観察される。

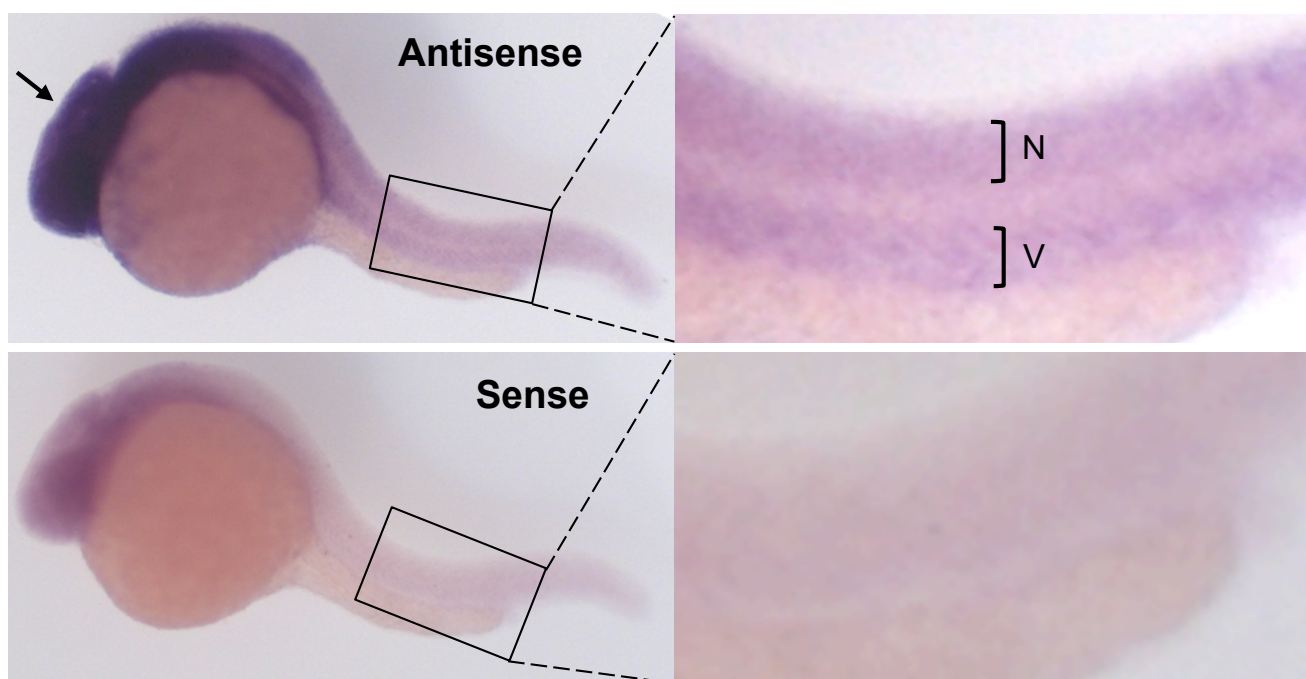


図 2-5. ATX の発現部位

Whole mount in situ hybridization法を用いてATXの発現部位を調べた。
30 hpfではATXは主に頭部(→)、神経管(N)、血管(V)に発現している

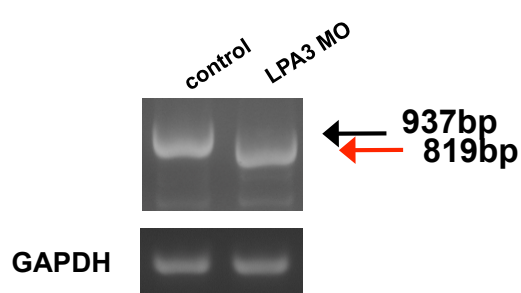
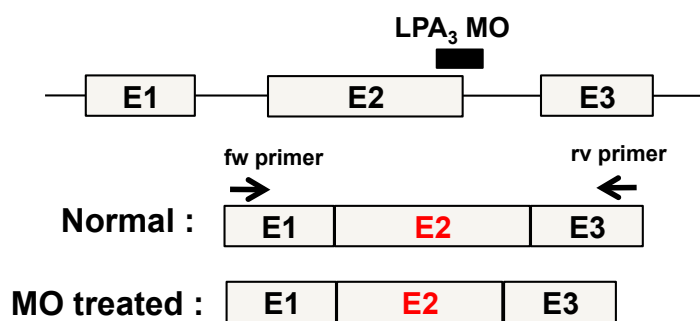
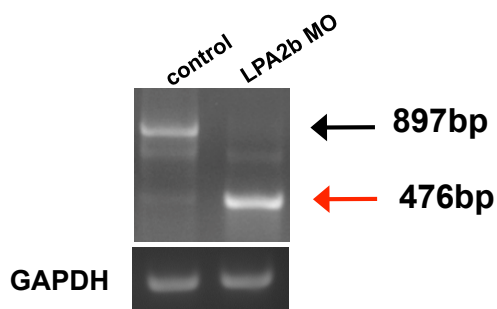
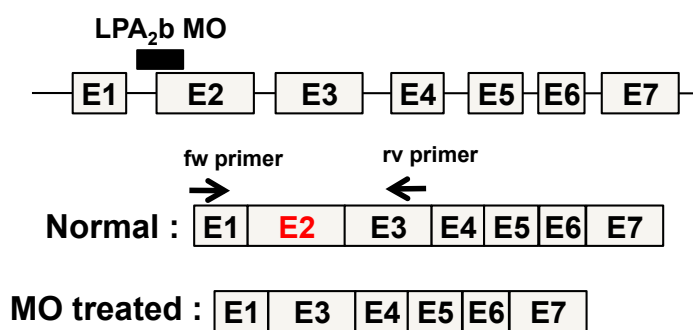
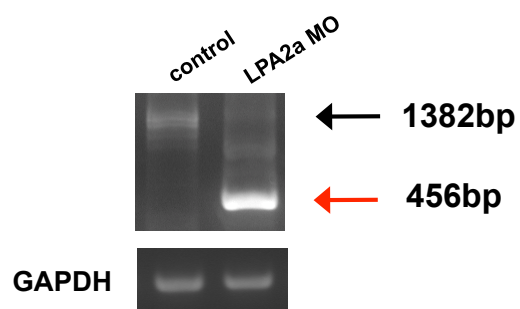
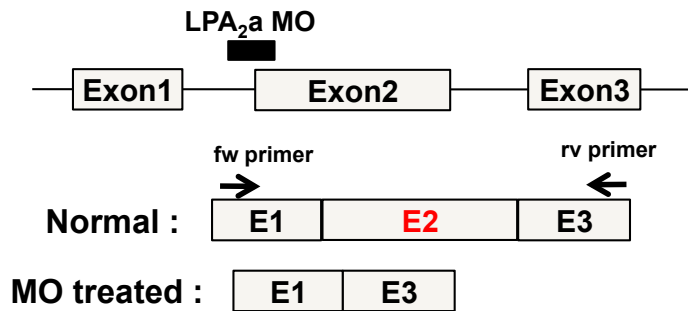
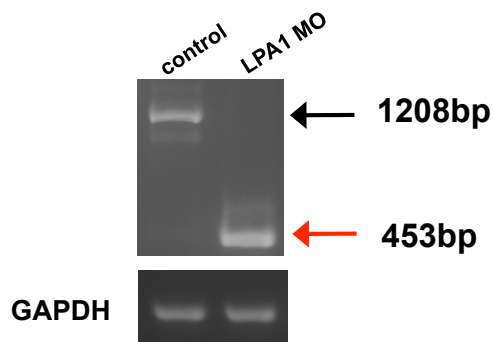
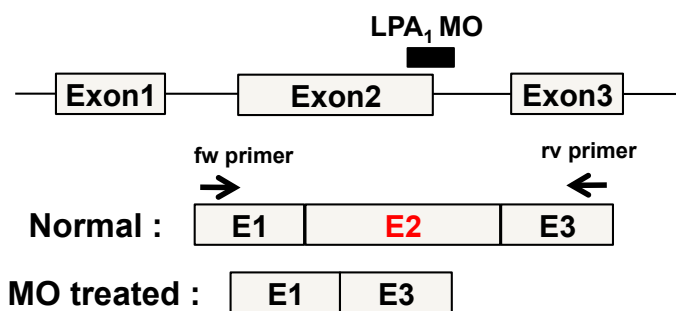


図 2-6. LPA₁₋₃ 受容体MOの効果確認

LPA₁, LPA_{2a}, LPA_{2b}, LPA₃ に対するスプライス阻害型MOの効果確認。
それぞれのPCR産物はシーケンス解析を行い、配列を確認している。

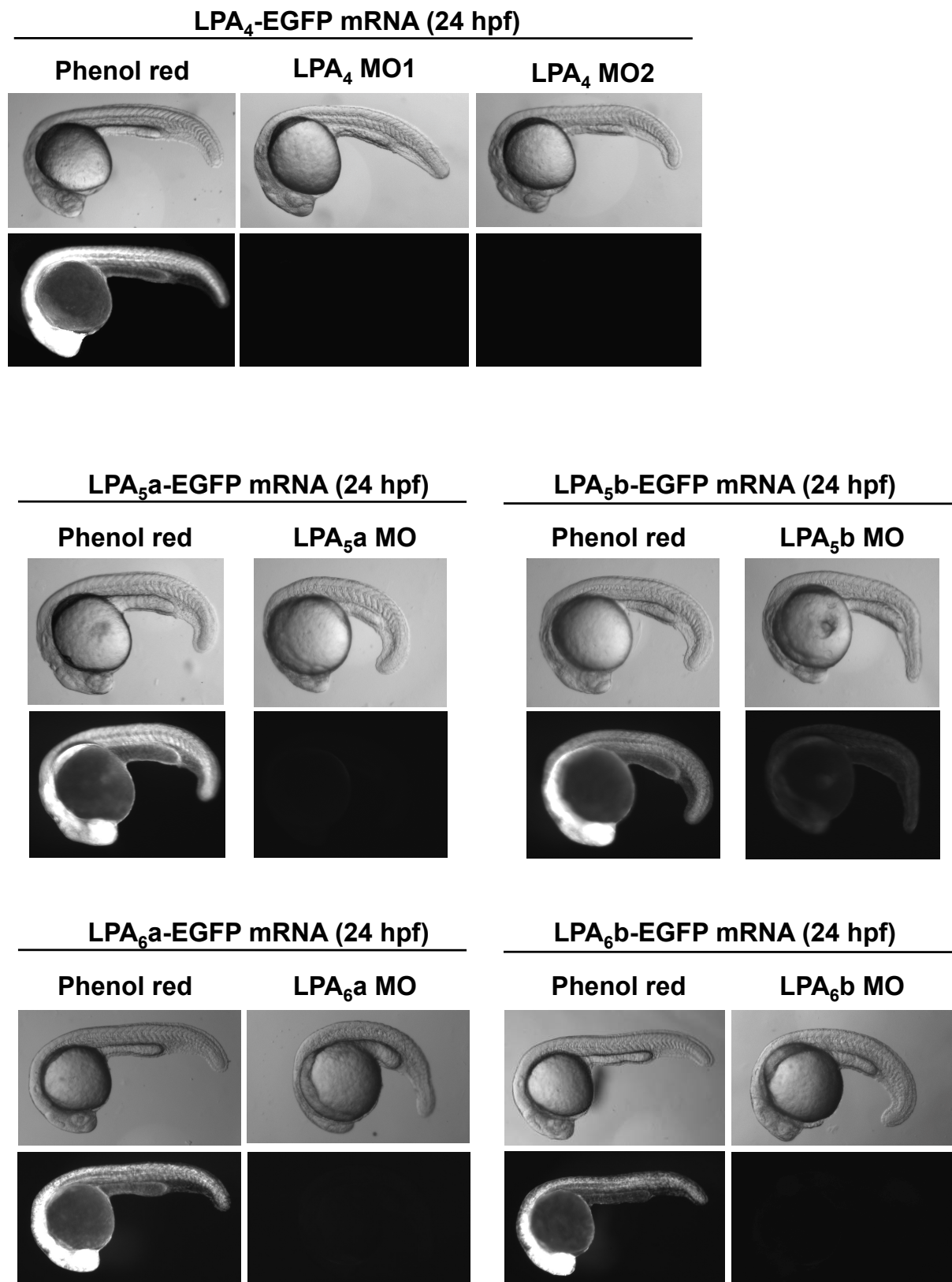
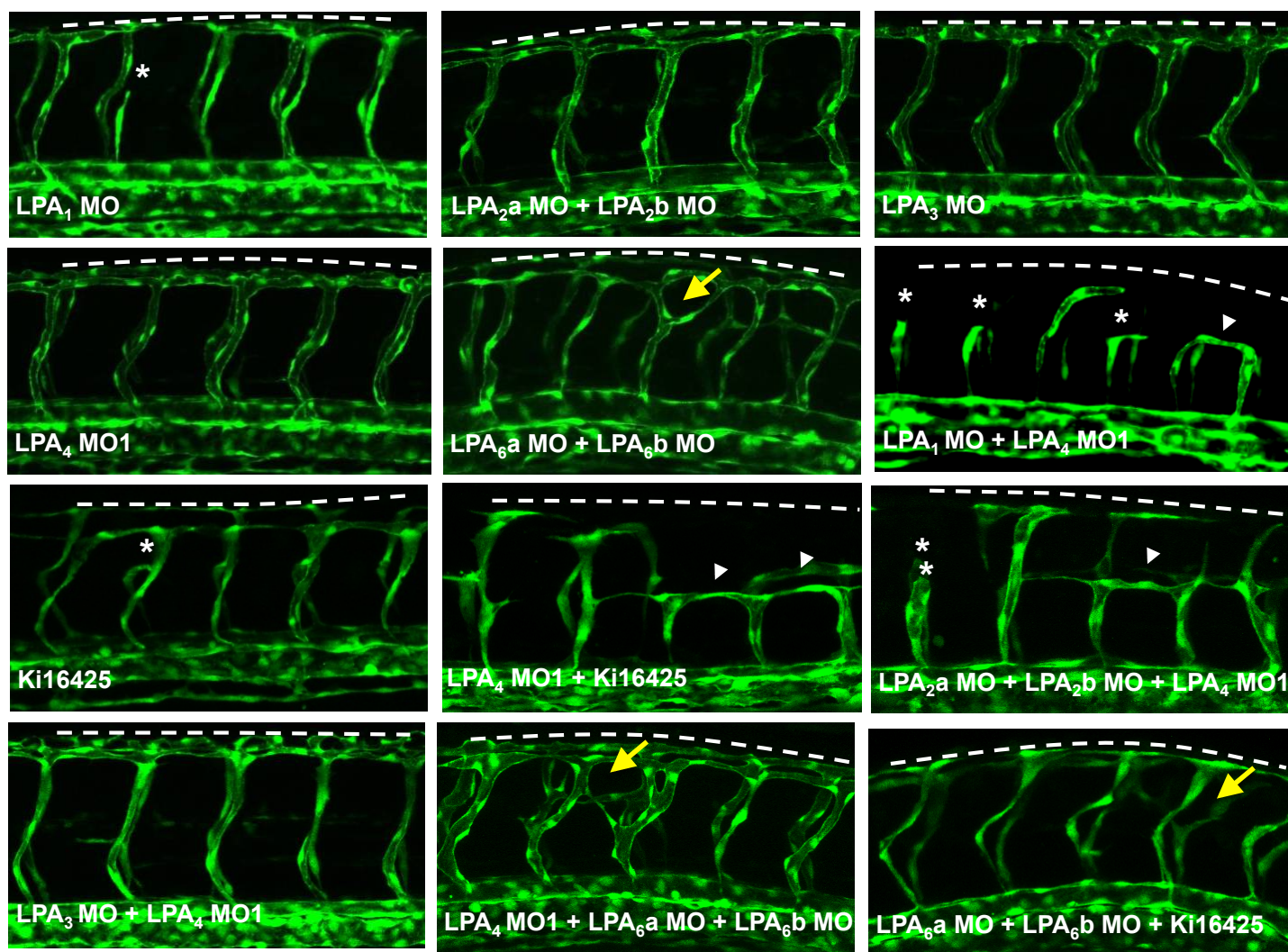


図 2-7. LPA₄₋₆受容体MOの効果確認

LPA₄, LPA_{5a}, LPA_{5b}, LPA_{6a}, LPA_{6b} に対する翻訳阻害型MOの効果確認。

A



B

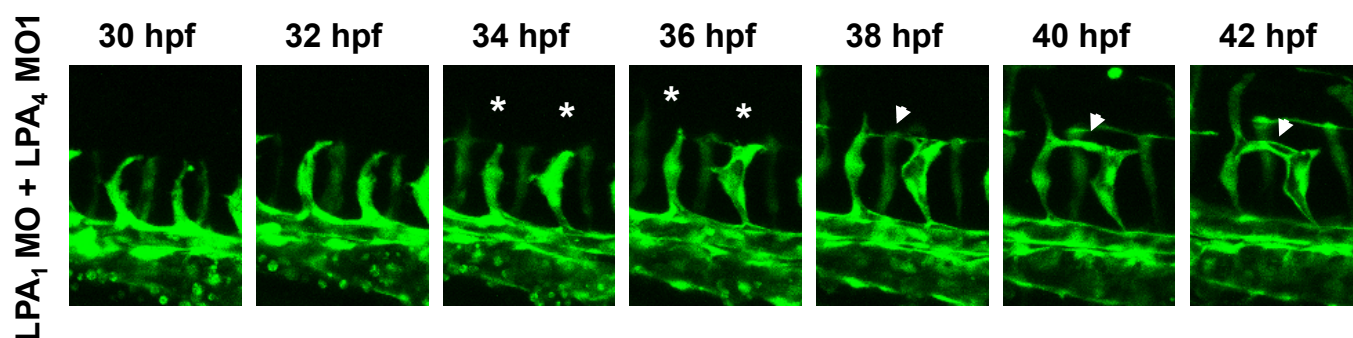


図 2-8. 各LPA受容体MOの血管形成に与える影響

A. 各LPA受容体を単独または組み合わせてノックダウンした胚の血管写真。
黄色矢印: 血管の異常な分岐構造

B. LPA₁, LPA₄ダブルノックダウン胚の20-42 hpfでの血管形成タイムラプス写真。

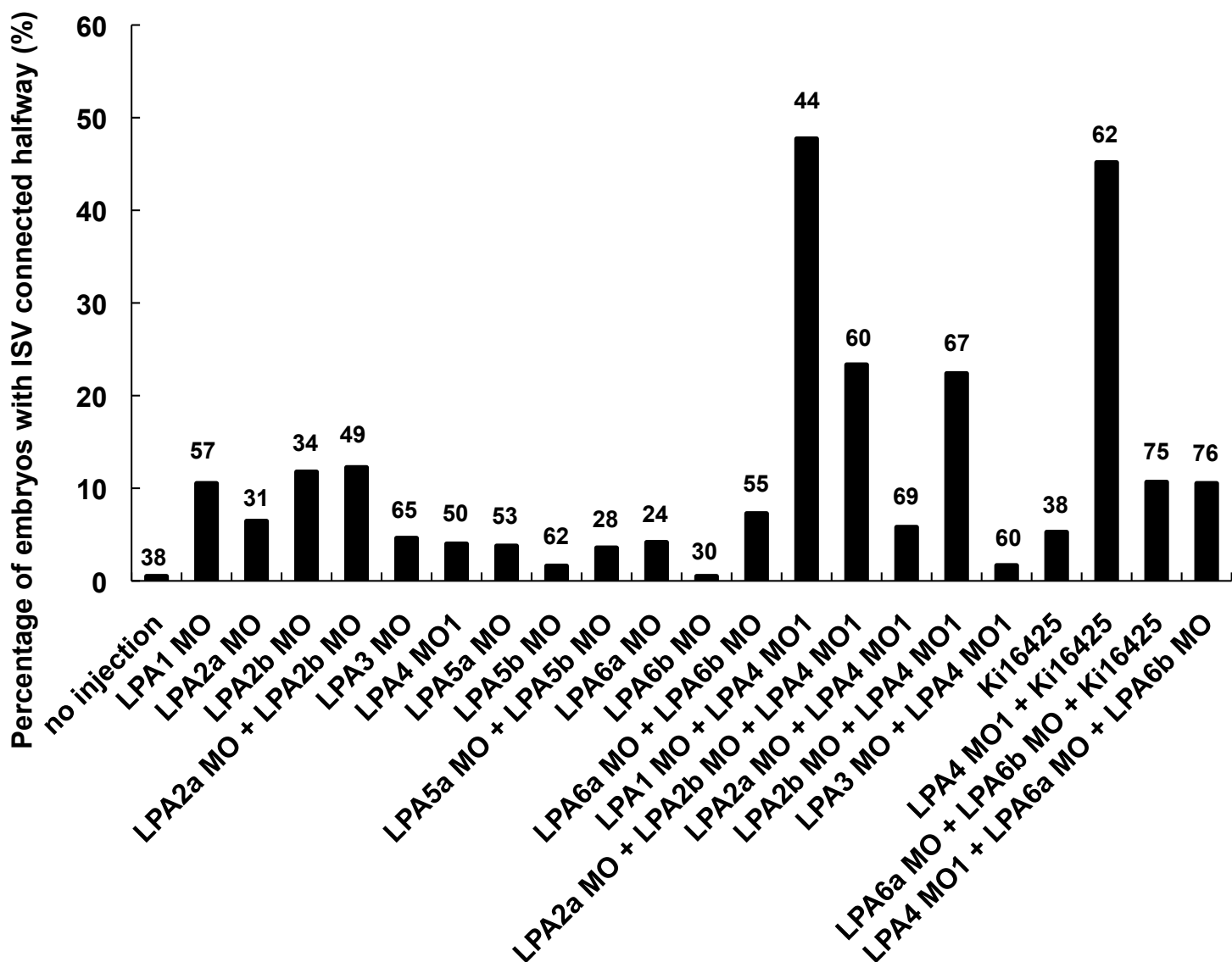


図 2-9. 各LPA受容体MOの血管形成に与える影響(定量したグラフ)
 グラフバーの上の数字は評価した個体数を示している。

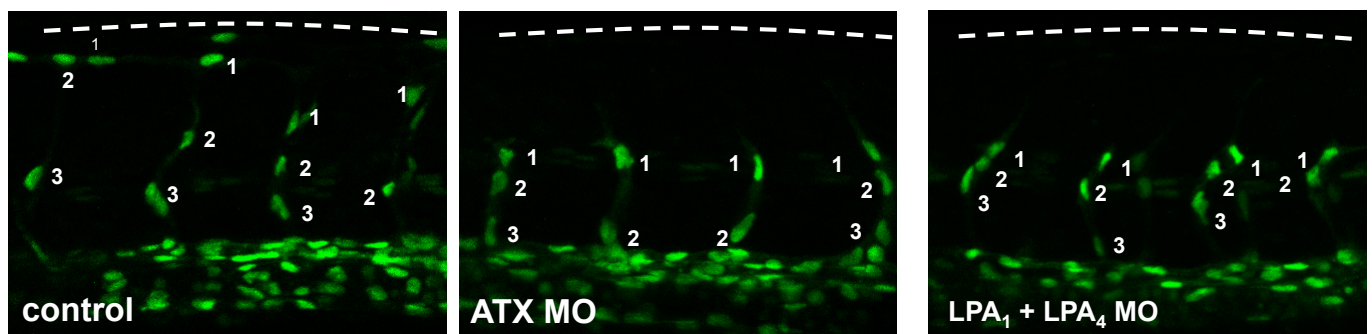


図 2-10. ATX または LPA_1/LPA_4 をノックダウンしてもISVを構成する細胞数に変化はない

コントロール胚もATX または LPA_1/LPA_4 ノックダウン胚でもISVを構成する細胞数は2-3個で変化は無い。

※数字は一本のISVを構成する細胞を背側から順に数えたもの。

第三章：

ゼブラフィッシュを用いた血管形成に
おける LPA 分解酵素 LPP3 の機能解析

第三章：ゼブラフィッシュを用いた血管形成における LPA 分解酵素 LPP3 の機能解析

【はじめに】

序章で述べたとおり、LPA は LPA に対して特異的な GPCR を介して多彩な機能を発揮する脂質メディエーターであるが、その産生系は他の生理活性を有するメディエーターと異なっている。通常、ホルモンやサイトカイン、成長因子などの生理活性物質は細胞内で産生され、特異的なトランスポーターまたはエキソサイトーシスを介して細胞外に放出される。しかし、LPA はその基質である LPC と産生酵素である ATX が細胞外に存在するため、細胞外で産生される。さらに LPC は体内には豊富に存在しているため（血中では数百 μM レベル）、ATX が存在する部位で LPA は一見、無制御に産生され続けるように思える。しかし、LPC, ATX が豊富に存在する血中では LPA の量はごく僅かであり（数十 nM レベル）、この LPA レベルがどのように制御されているのかは未だ解析されておらず、不明なままである。そこで、我々は LPA の制御メカニズムとして lipid phosphate phosphatase (LPP) に着目した。

LPP family は 6 回膜貫通型のタンパク質であり、さまざまなリン脂質を脱リン酸化する活性を有していることが知られている（図 3-1）(35)。LPP family には LPP1, LPP2, LPP3 の三つが存在している。

この LPP family の生体内における機能はほとんどわかっていない。genetrap 法により作製された LPP1 の発現が減少した LPP1 トランスジェニックマウスが報告されており、このマウスは血中 LPA の半減期が野生型マウスより長くなっているが、目立った表現型は見られない(36)。LPP2 KO マウスも報告されているが、このマウスも目立った表現型は見られない(37)。LPP3 KO マウスは序論でも

述べたように、血管形成異常を伴い胎生致死であることが報告されている。しかしながら LPP3 は LPA、ホスファチジン酸 (PA)、スフィンゴシン 1 リン酸 (SIP)、セラミド 1 リン酸 (C1P) を分解する活性を有するほかに、リン脂質を分解する活性とは非依存的に β -カテニン依存的な遺伝子の転写を阻害することが知られているため (図 3-2 A)、LPP3 KO による血管形成異常のメカニズムはわかっていなかった(38)。

当研究室において ATX を過剰発現するトランスジェニックマウスが作製・解析され、この ATX 過剰発現マウスが LPP3 KO マウスと非常に類似した血管形成異常を示すことが明らかとなった (図 3-2 B)。この表現型の類似から、我々は LPP3 KO マウスの血管形成異常という表現型は LPA が過剰になった結果ではないかと考えた。つまり、通常時生体内では LPP3 が LPA を分解し制御していることを想定した。この仮説を検証するため、ゼブラフィッシュを用いて LPP3 ノックダウンによる血管形成異常メカニズムを解析した。

【方法】

特に記載のない試薬は和光純薬工業より購入した。

1. MO 設計

MO は LPP3a, LPP3b に対してスプライシング阻害型 MO (MO1)、翻訳阻害型 MO (MO2)をそれぞれひとつずつ設計した。作成した MO と使用したプライマーの配列は以下の通りである。

LPP3a スプライシング阻害型 : 5' - ACAATCTGGAGAACGATTCATTCAC -3'

LPP3a 翻訳阻害型 : 5' - CCTTCTCATACATATAGTTTTGCAT -3'

LPP3b スプライシング阻害型 : 5' - AGGCTGTCAAGAGAGAGACATACAC -3'

LPP3b 翻訳阻害型 : 5' - AATTCAACTTCTGCATGATGTCCGT -3'

LPP3a スプライシング阻害型 MO は PCR によって標的遺伝子の正常なスプライシングが阻害されていることを確認した。LPP3a 翻訳阻害型 MO は MO ターゲット配列の下流に EGFP 遺伝子がコードされている mRNA を作製し、その mRNA の翻訳が阻害されることを確認した。

Primer (LPP3a MO 効果確認)

fw : 5'- TGGAAGCAAATCCAAGCATC -3'

rev : 5'- CGCCATGTGAATCGAGACTG -3'

2. mRNA 作製

mRNA は mMESSAGE mMACHINE kit (Ambion)を用いて作製した。mRNA は 1〜4 細胞期の受精卵の yolk に 1〜2 nl インジェクションした。mRNA の合成方法、インジェクション方法は第二章に同じ。

3. LC-MS/MS による脂質解析

受精後 30 時間後のゼブラフィッシュ 50 匹を 1.5mL チューブに入れ、そこに deysolking buffer (55mM NaCl, 1.8mM KCl, 1.25mM NaHCO₃) を加え、P200 黄色チップ(739296, Greiner Bio-one) でサスペンドすることでゼブラフィッシュのヨーク部分を除去した。次に室温で 5 分間 direct mixer (DM-301, AS ONE Corp.) でシェイクした。30 秒間 300g で遠心し、上清を除去した。1 ml の wash buffer (110mM NaCl, 3.5mM KCl, 2.7mM CaCl₂, 10mM Tris-HCl, pH 8.5) を加え、数回サスペンドし、30 秒間 300 g で遠心し、上清を除去した。そのペレットに内部標準として 17:0 LPA を添加した MeOH を 100 μ L (100 nM 17:0 LPA) 加え、ハンディ型超音波ホモジナイザー (Smurt NR-50M, MICROTEC) を用いて氷上で sonication (3 秒 3 回、インターバル 3 秒) した。sonication したサンプルは 15000 g, 5min 4°C で遠心し、上清をフィルターを用いてろ過し、LC にインジェクションした。LC 分離条件は NAnospace システム (資生堂) を用いて次の通りおこなった。カラム : CAPCELLPAK C18 ACR (資生堂) 1.5 \times 250 mm、移動相 : 5 mM ギ酸アンモニウム (pH 4.0) 及び 5 mM ギ酸アンモニウム-95 %アセトニトリル (pH 4.0) のグラジエント。

MS/MS 解析はトリプル四重極 MS TSQ QuantumUltra (Thermo) を用いて行った。

4. 免疫染色

受精後 48 時間後の胚を 2%PFA-PBS で 4°C オーバーナイトで固定後、PBST (PBS + 0.1% Tween-20) で wash 後に、室温で 30 分間 PBST + 0.5% TritonX-100 で処理した。その後 Blocking Solution (PBST, 0.1% TritonX-100, 10% normal goat serum, 1% BSA, 0.01% sodium azide) に置換し、4°Cで一晩処理後、1 次抗体に anti-zebrafish CDH5 (ラット抗血清)、2 次抗体に goat-anti rabbit F(AB)₂ – Alexa 568 (Invitrogen) を使用し、染色した。1 次抗体、2 次抗体処理後は PBST で 60 分 \times

5 回 wash 操作を行った。

5. ゼブラフィッシュ LPP3a, 3b のクローニング

受精後 24 時間のゼブラフィッシュをマイクロチューブに入れ、CDS 溶液 (1mM EDTA, 70ug/ml アプロチニン, 0.3mM PMSF, 50 μ g/ml PMSF, 70ug/ml leupeptin の濃度になるように PBS で希釈) 中でピッペティングすることでヨークを除去した。遠心後、上清を除去し、ペレットに対して total RNA を GeneElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) を用いて mRNA を単離し、High capacity cDNA RT Kit (Applied Biosystems) にて逆転写を行った。以下のプライマーを用いて PCR し、Sma1 と Xba1 の制限酵素サイトを利用して pCS2+ ベクターにクローニングした (LPP3a-pCS2+, LPP3b-pCS2+)。

LPP3a

1st fw 5'-ACATCAGAAGGAACTCTAAC-3'

1st rev 5'-AATGCAGACTCCCGGTCCTC-3'

2nd fw 5'-AAACCCGGGACCACCATGCAAACTATATGTATGA-3'

2nd rev 5'-AATCTAGACTACACCATGTTGTGATGGT-3'

LPP3b

1st fw 5'-GTATTGAATTTTACGGACATC-3'

1st rev 5'-TGTTTCTGTGTGCAGATCTG-3'

2nd fw 5'-AAACCCGGGACCACCATGCAGAAGTTGAATTCGGT-3'

2nd rev 5'-AATCTAGATTAGCAGACGGTCTGCTGGC-3'

LPP3a-pCS2+, LPP3b-pCS2+ をテンプレートとして以下のプライマーで PCR を行い、pCS2-EGFP ベクターにクローニングすることで LPP3 の C 末に EGFP タグを付加した。制限酵素サイトは Sma1 と Xba1 を用いた。

LPP3a

fw: 5'- AAACCCGGGACCACCATGCAAAACTATATGTATGA -3'

rev: 5'- AATCTAGACACCATGTTGTGATGGTTGT -3'

LPP3b

fw: 5'- AAACCCGGGACCACCATGCAGAAGTTGAATTCGGT -3'

rev: 5'- AATCTAGATTAGCAGACGGTCTGCTGGC -3'

PCR によって LPP3a の 196 番目のセリンがスレオニンになるように、LPP3b の 217 番目のセリンがスレオニンになるように変異を導入し、LPP3a (S196T)、LPP3b (S217T) を作成した。用いたプライマーの配列は以下の通りである。まず fw-1 と rev-1、fw-2 と rev-2 で PCR を行い、目的産物を切り出し精製後、両者を混合する。混合物をテンプレートにして fw-1 と rev-2 で PCR を行う。PCR 産物と pCS2+ベクターを制限酵素 Sma1 と Xba1 で処理しクローニングした。

LPP3a

fw-1: 5'- AAACCCGGGACCACCATGCAAAACTATATGTATGA -3'

rev-1: 5'- ATGTCCGGTAAAGAAGGATT -3'

fw-2: 5'- TTCTTTACCGGACATGCTTC -3'

rev-2: 5'- AATCTAGACTACACCATGTTGTGATGGT -3'

LPP3b

fw-1: 5'- AAACCCGGGACCACCATGCAGAAGTTGAATTCGGT -3'

rev-1: 5'- TTCTTCACGGGCCATGCATC -3'

fw-2: 5'- ATGGCCCGTGAAGAAGGATT -3'

rev-2: 5'- AATCTAGATTAGCAGACGGTCTGCTGGC -3'

6. LPA 分解活性測定

HEK 細胞は DMEM (SIGMA)、10%非動化 FCS (JSH)、L-glutamine 2 mM/ml (GIBCO)、penicillin 100 UI/ml (SIGMA)、streptomycin 0.1 mg/ml (GIBCO) にて維持した。

LPP3a, 3b in pCS2+ ベクターを、HEK293 細胞に lipofectamine 2000 (invitrogen) を用いてトランスフェクションした。24 時間後、メディウムを DMEM (0.1% BSA, FCS 不含) に置換した。一時間後、40 μ M LPA を含む DMEM (1% BSA, FCS 不含) に置換し、さらに一時間後に培養上清を回収し、LPA 濃度を LC-MS/MS のシステムを用いて測定した。

7. アライメント解析

LPP3 のアミノ酸配列は National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースから取得した。アライメントに用いた LPP3 のタンパク質の配列の Accession Number は以下の通りである。

Homo sapiens: NP_003704

Mus musculus: NP_542122

Xenopus tropicalis: NP_001016858,

Danio Rerio: lpp3a→XP_001919561, lpp3b→NP_001073447

8. Whole mount *in situ* hybridization (*lpp3a*)

受精後 30 時間後の胚を用い常法にて行った。ゼブラフィッシュを 4%PFA-PBS 中室温で 4 時間固定後、MeOH にて脱水し、使用するまで-20℃で保存した。後の操作は第二章に同じ。

9. 定量 RT-PCR による遺伝子発現解析

ゼブラフィッシュより、GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (SIGMA) を用いて付属のプロトコールに従い、total RNA を抽出した。その後、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて付属のプロトコールに従い、cDNA を合成した。cDNA 溶液は、MilliQ water を用いて 3 倍希釈したものを使用した。その後、SYBR Green PCR Master Mix (Takara) を用いて付属のプロトコールに従い、Real time PCR system (Applied Biosystems, ABI Prism 7300) を使用して定量 PCR を行った。得られたデータは、house-keeping gene である elf1a のコピー数で補正を行った。プライマーの配列は以下の通りである。

LPP3a

Fwd: 5'-CCGGTTTATCACGAGTGTCTG-3'

Rev: 5'-GGCTGTCTTAGCTTTGGGTTTG-3'

LPP3b

Fwd: 5'-TGGAGGAAGCCAGAAAATCC-3'

Rev: 5'-CCAACATCACCAACATGAACTG -3'

elf1a

Fwd: 5'-ACTCTTCTTGATGCCCTTGATG-3'

Rev: 5'-AGTCTCCACACGACCCACAG-3'

【結果】

1. LPP3 はゼブラフィッシュで保存されている

まず、ゼブラフィッシュでも LPP3 が保存されているか確認した。ゼブラフィッシュ LPP3 を NCBI データベースで調べたところ、ゼブラフィッシュ LPP3 は重複して存在していた。ヒトと比べてタンパクレベルで約 70%の相同性のものを LPP3a, 約 40%の相同性のものを LPP3b とした。この LPP3a, LPP3b のどちらも LPP のリン脂質脱リン酸化に重要な細胞外ドメイン (C1, C2, C3) は高度に保存されていた (図 3-3)。

2. ゼブラフィッシュ LPP3 も LPA 分解活性を有する

次に、LPP3a, LPP3b が LPA を分解する活性を有しているか調べた。クローニングした LPP3a, LPP3b を HEK293 細胞に一過的に発現させ、培養上清中に LPA を加えてその LPA の分解量を測定した。その結果、LPP3a, LPP3b はどちらも LPA を分解する活性を有しており、さらにアミノ酸配列から活性中心と予想されるセリンをスレオニンに置換した変異体では LPA 分解活性を示さなかった (図 3-4 A)。LPP3a, LPP3b が細胞表面にあるかを調べるために、LPP3 の C 末に EGFP を付加した融合タンパクを HEK に発現させ、観察したところ、実際に LPP3a, LPP3b はどちらも細胞膜表面に存在することがわかった (図 3-4 B)。

3. LPP3a は主に血管に発現している

各発生段階における LPP3a, LPP3b の mRNA 発現量を定量 RT-PCR により測定した。その結果、血管新生が生じる時期 (24-48 hpf) には LPP3a が LPP3b より 10 倍程高発現していることがわかった (図 3-5)。次に Whole mount *in situ* hybridization 法を用いて LPP3a の発現部位を調べた。30 hpf では LPP3a は主に血

管に発現していることがわかった (図 3-6)。zLPP3b についても同様に Whole mount *in situ* hybridization を行ったが、発現量が低いためシグナルを観察することができなかった。

4. LPP3a ノックダウンにより血管形成異常が生じる

LPP3a は LPP3b に比べ、相同性・LPA 分解活性・発現量が高いことから、まず LPP3a の機能を解析しようと考え、LPP3a に対する MO を作製した (スプライス阻害型 (spMO)、翻訳阻害型 (atgMO) を一つずつ) (図 3-7 A)。LPP3a spMO を投与したゼブラフィッシュ (受精後 48 時間) から mRNA を抽出し、逆転写した後、PCR 反応を行い、LPP3a spMO 投与により異常な mRNA ができていることを確認した (図 3-7 B)。また LPP3 atgMO は MO ターゲット配列の下流に EGFP 遺伝子をコードした mRNA の翻訳を阻害することが確認できた (図 3-7 C)。LPP3a MO を投与し、48 hpf で血管形成を観察した。LPP3a をノックダウンした個体ではコントロールに比べて血管の管腔構造が見られず、動脈と ISV の結合が切れて退縮している様子が観察された (図 3-8A, B)。血管形成をタイムラプス撮影したところ、コントロール胚では 36 hpf からだんだんと血管の管腔構造が出来ていくのに対して、LPP3a ノックダウン胚では管腔は形成されず、血管が退縮していく様子が観察された (図 3-8 C)。しかし、LPP3b に対する MO を 2 つ作製し、ノックダウンしたが血管形成異常は見られなかった (図 3-9)。このことから LPP3a が血管形成に重要であると考え、今後は LPP3a に着目し、解析を行った。

5. LPP3a ノックダウンにより VE-cadherin を介した内皮細胞間接着が弱まる

次に、この LPP3a ノックダウンにより生じる血管の退縮というのは内皮細胞

間の接着が弱まり結合が維持できなくなってしまうせいで生じるのではないかと考え、内皮細胞間の接着に重要な VE-cadherin を免疫染色で可視化し、観察した。LPP3a ノックダウン胚では内皮細胞がある部位でも VE-cadherin のシグナルが観察されないことから VE-cadherin による接着が弱まっていることが考えられる (図 3-10 A)。この VE-cadherin による内皮細胞同士の接着が弱まることで、LPP3a ノックダウン胚で見られる血管異常が生じるのかを調べるために、VE-cadherin をノックダウンし、血管を観察した。すると VE-cadherin ノックダウン胚でも LPP3a ノックダウン胚と同様の血管の管腔の未形成、血管の退縮が観察された (図 3-10 B)。

6. LPP3a ノックダウンによる異常は LPA_{6a} 受容体のノックダウンによりレスキューされる

この LPP3a ノックダウン胚の表現型が LPA を介しているかどうかを調べるために、LPA 産生酵素である ATX または LPA 受容体を LPP3a と同時にノックダウンし、LPP3a ノックダウンによって生じる血管形成異常がレスキューされるかどうか調べた。LPP3a ノックダウンにより約 50%の個体で血管の退縮が生じるが、ATX または LPA_{6a} を同時にノックダウンした場合に血管の退縮を示す個体が有意に減少した。このことから LPP3a ノックダウンによる血管の退縮の原因の一部は過剰な LPA シグナルによるものだと考えられる (図 3-11 A, B)。そこで実際にゼブラフィッシュの体内で LPA 量が増加しているかどうかを調べた。ゼブラフィッシュをすりつぶし、脂質を抽出し、各種リゾリン脂質を LC-MS/MS を用いて定量した。コントロール胚にくらべ LPP3a ノックダウン胚では検出できた全ての脂肪酸種において LPA 量が有意に増加していたが、他のリゾリン脂質についてはほとんど変化が無かった (図 3-12)。

7. ATX 過剰発現により、LPP3a ノックダウン時と同様の血管形成異常を示す

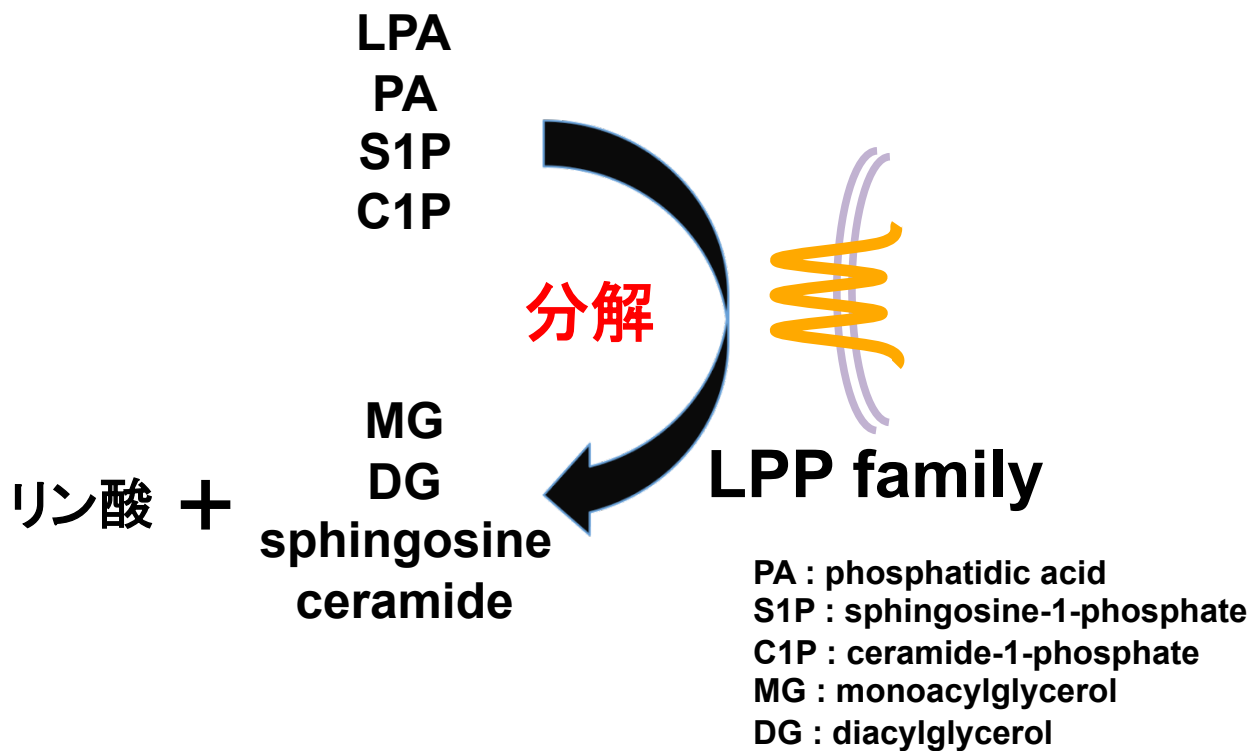
LPA が過剰になることで血管の退縮、管腔の未形成が生じることが示唆されたので、LPA 産生酵素である ATX を過剰発現させることでもこの表現型が生じるのかを調べた。実際に ATX を過剰発現させると血管の退縮、管腔の未形成が生じた。ATX の活性中心を変異させ LPA 産生活性を失った ATX を過剰発現させた場合は血管形成異常を生じなかった (図 3-13)。

【考察】

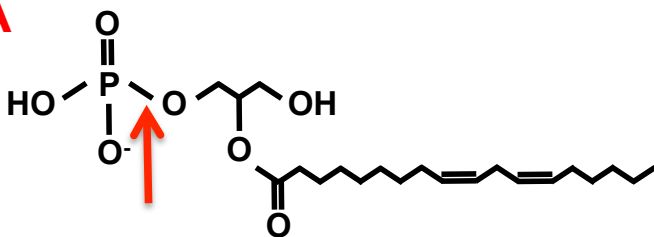
以上の結果より、LPP3a ノックダウン胚では生体内で LPA 量が増加し、LPA_{6a} 受容体に過剰なシグナルを送ることで、VE-cadherin による内皮細胞間接着を抑制していることが示唆された。おそらく LPP3 KO マウスの表現型も LPA が過剰になったために内皮細胞間接着が弱まった結果だと考えられる。VE-cadherin の KO マウスも報告されているが、やはり LPP3 KO マウスと類似の血管形成異常を示し胎生致死である(39)。しかし、LPP3a ノックダウンによる血管の退縮は ATX または LPA_{6a} のノックダウンにより完全にレスキューされていないことから、別のメカニズムで血管内皮細胞の接着が弱まっている可能性もある。例えば LPP3 が分解する基質のひとつである S1P は高濃度 (5 μ M) で血管内皮細胞の接着を弱める作用を持つことが報告されている(40)。この可能性を検証するために S1P 受容体を同時にノックダウンすることで LPP3a ノックダウンによって生じる血管の退縮がレスキューされるかどうか調べる必要がある。

また今回、LPP3a がノックダウンしたときに LPA_{6a} にシグナルが入ることで血管形成異常が生じたが、第二章で述べたように LPA_{6a} 単独でノックダウンした場合も血管形成異常が生じることからおそらく LPA_{6a} にはシグナルが適切な量だけ伝わる必要があると考えられる。LPP3 は血管内皮細胞間接着を適切に制御するために LPA_{6a} へ伝わるシグナルを調節していることが示唆される。

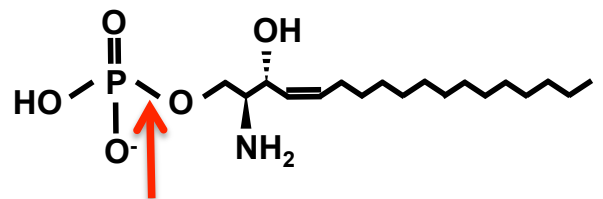
次に、ゼブラフィッシュで明らかとなったメカニズムが哺乳類でどうなっているかを調べようと考えた。具体的にはヒト内皮細胞を用いて LPA が LPA₆ 受容体を介して VE-cadherin の接着を抑制するのかどうかを調べ、さらにその受容体の下流でどのような分子が動き、接着抑制を生じているのか詳細に解析しようと試みた (第四章)。



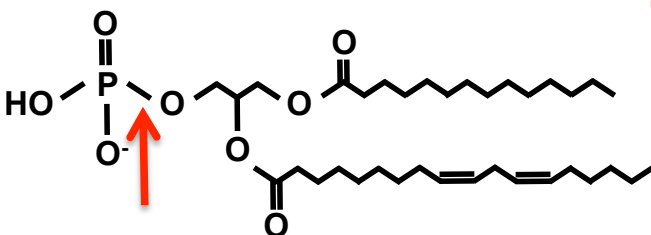
LPA



S1P



PA



C1P

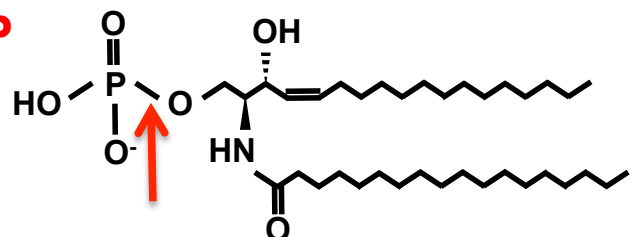
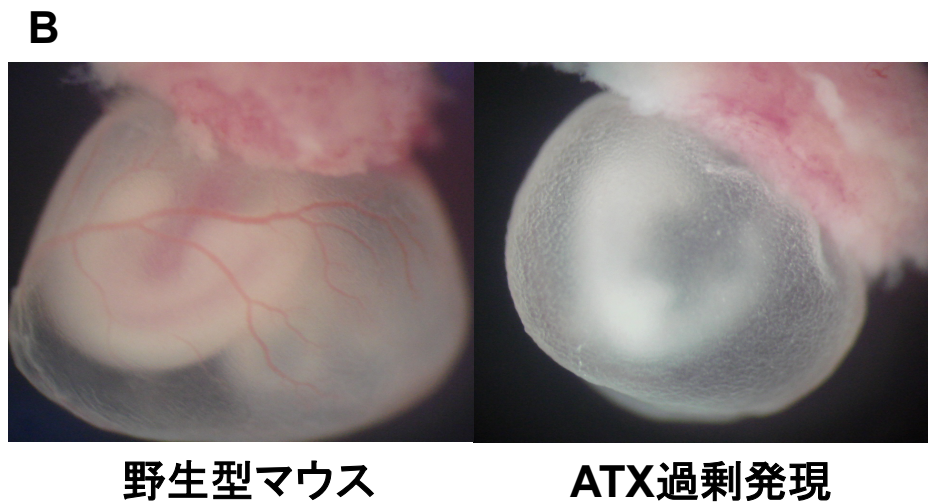
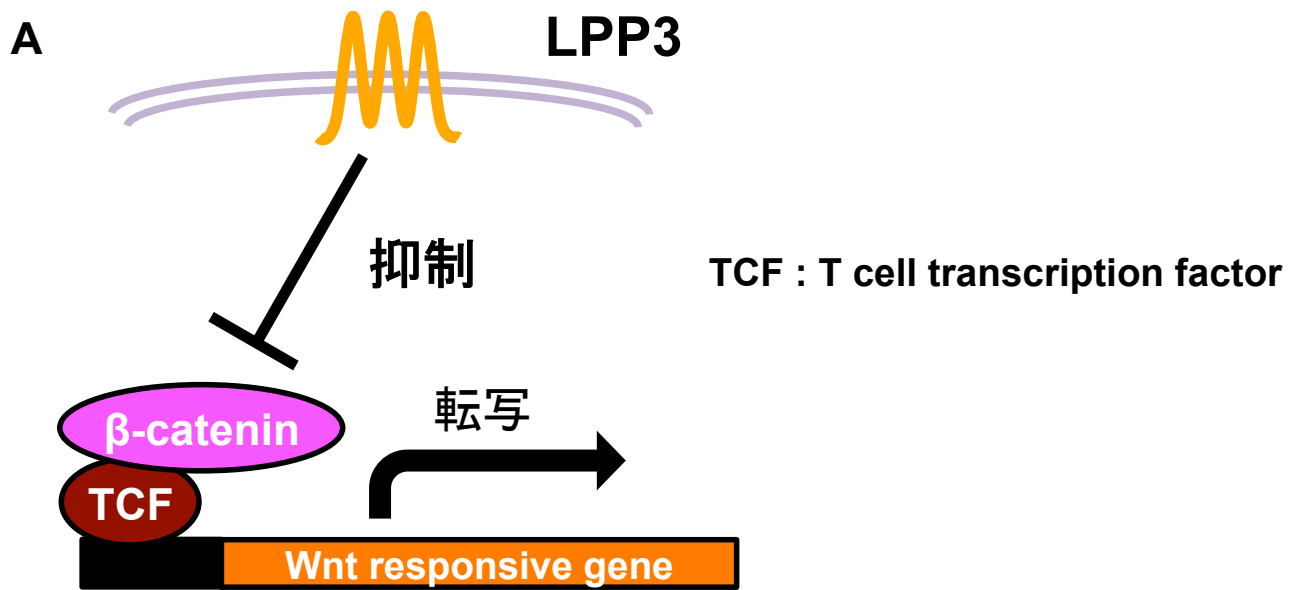


図 3-1. LPP family はリン脂質を脱リン酸化する活性を有する
 LPP family はLPA, PA, S1P, C1Pを脱リン酸化する活性を有する。






上: 野生型マウス
下: LPP3 KOマウス

Escalante-Alcalde et al. (2003) *Development*

図 3-2. ATX過剰発現マウスとLPP3 KOマウスは類似の血管形成異常を示す
A, LPP3はリン脂質を脱リン酸化する活性を有するほか、β-カテニン依存的な遺伝子の転写を阻害する活性を有する。

B, ATX過剰発現マウスとLPP3 KOマウスは類似の血管形成異常を生じる。

hLPP3.seq	1	-----MQNYKYDKAIVPESKNGGSPALNNNPRRSGSKRVLLIICLDLF	42
mLPP3.seq	1	-----MQSYKYDKAIVPESKNGGSPALNNNPRKGGSKRVLLIICLDLF	42
xlpp3.seq	1	-----MQNYKYDKAMGPESRNGGTAALNNNNGTSNCRRLIIFLDVF	42
zLPP3a.seq	1	-----MQNYMYEKAMAPETRNGGTSTLNNNGVNNS-KRKLLIALDIF	41
zLPP3b.seq	1	MQKLSNVNSMNSLQQLADNGGSGEAARENGTKHILSPAEPVDTVQCSSRKMLVGLDIL	60
hLPP3.seq	43	CLFMAGLPFLIIETSTIKPYHRGFYCNDESIKYPLKTGETINDAVLCAVGIVIAILAIIT	102
mLPP3.seq	43	CLFMAALPFLIIETSTIKPYRRGFYCNDESIKYPLKVSETINDAVLCAVGIVIAILAIIT	102
xlpp3.seq	43	CLIVAGLPFLIIETSTIQPYRRGFYCDDESIKYPAANSGETISDAVLSAVGILIAILAIIV	102
zLPP3a.seq	42	CLVLVMLPSMVLHKSTVQPYQRGFYCSDDSIYAYKNS-TVPSSVLTAVGLLLPIASIVI	100
zLPP3b.seq	61	CLLVASIPFFACELKAVTPYMRGFFCGDTSITYPYIESEAIPDSVLIAGGIITGLTIAV	120
hLPP3.seq	103	GEFYRIYYLK-KSRSTIQNPYYAALYKQVGCFLFGCAISQSFTDIKAVSIGRLRPHFLSV	161
mLPP3.seq	103	GEFYRIYYLKEKSRSTIQNPYYAALYKQVGCFLFGCAISQSFTDIKAVSIGRLRPHFLSV	162
xlpp3.seq	103	GEFFRIHYLKERPHSFIONPYVAALYKQVGCFAFGCAVSQSFTDIKAVSIGRLRPHFINV	162
zLPP3a.seq	101	GECYRIHYLSQGSKSFVGNPYVSALYRQVGVFTFGCAVSQSFTDIKAVSVGRMRPHFLDV	160
zLPP3b.seq	121	GECYRVFRFDVHSRAFRNLYVSCLYKELGSFLFGCCVQSILTINMAKLSVGRMRPHFLSA	180
		* 	
hLPP3.seq	162	CNPDFSQINCSEG-YIQNYRCRGDDSKVQEARKSFFSGHASFSMYTMLYLVLVYLQARFTW	220
mLPP3.seq	163	CDPDFSQINCSEG-YIQNYRCRGEDSKVQEARKSFFSGHASFSMYTMLYLVLVYLQARFTW	221
xlpp3.seq	163	CNPDFSQINCSEG-YIQNYRCRGEDSKVQEARKSFFSGHASFSMYTMLYLVLVYLQARFTW	221
zLPP3a.seq	161	CRPNYSTIDCSLG-YITEYTCGDPKSKVQEARKSFFSGHASFSMYTMLYLAFYLSRFTW	219
zLPP3b.seq	181	CNVTYESLNCPTGYTISHVVCSSKKIVQEARKSFFSGHASFMYTMLYLAFYLSRFTW	240
			
hLPP3.seq	221	RGARLLRPLLQFTLLIMAFYTGLSRVSDHKHHPSDVLAGFAQGALVACCIVFFVSDLFKT	280
mLPP3.seq	222	RGARLLRPLLQFTLLIMAFYTGLSRVSDYKHHPSDVLAGFAQGALVACCIVFFVSDLFKT	281
xlpp3.seq	222	RGARLLRPLLQFTLLIMAFYTGLSRVSDHKHHPSDVLAGFVQGALVAYCIVFFVSDLFKT	281
zLPP3a.seq	220	RGARLLRPLLQFTLLIMAFYTGLSRVSDHKHHPSDVLAGFVQGALVAYCIVFFVSDLFKP	279
zLPP3b.seq	241	QGARLLRPLLQFMLVMLAVYTGLSRISDYRHHPDVLVTGFLQGGLTAYWVAFYISSMFKT	300
			
hLPP3.seq	281	KTTLSPAPA-IRKEILSPVDIIDRNNHHNMM	311
mLPP3.seq	282	KTSLSPAPA-IRREILSPVDIIDRNNHHNMV	312
xlpp3.seq	282	PKKSCPT-PT-VKKEILSPVDIERNIV----	307
zLPP3a.seq	280	KAKTATPPSPISKELLPSDDIERNHHNMMV	311
zLPP3b.seq	301	SRPDMSPSTLSLESPLSSQQTVC-----	323




 C1 domain
 C2 domain
 C3 domain

図 3-3. LPP3のアライメント解析

ヒト(hLPP3)、マウス(mLPP3)、アフリカツメガエル(xLPP3)、ゼブラフィッシュ(zLPP3a, zLPP3b)のLPP3のアミノ酸配列をアライメントした。

* は活性中心のセリンを示している。

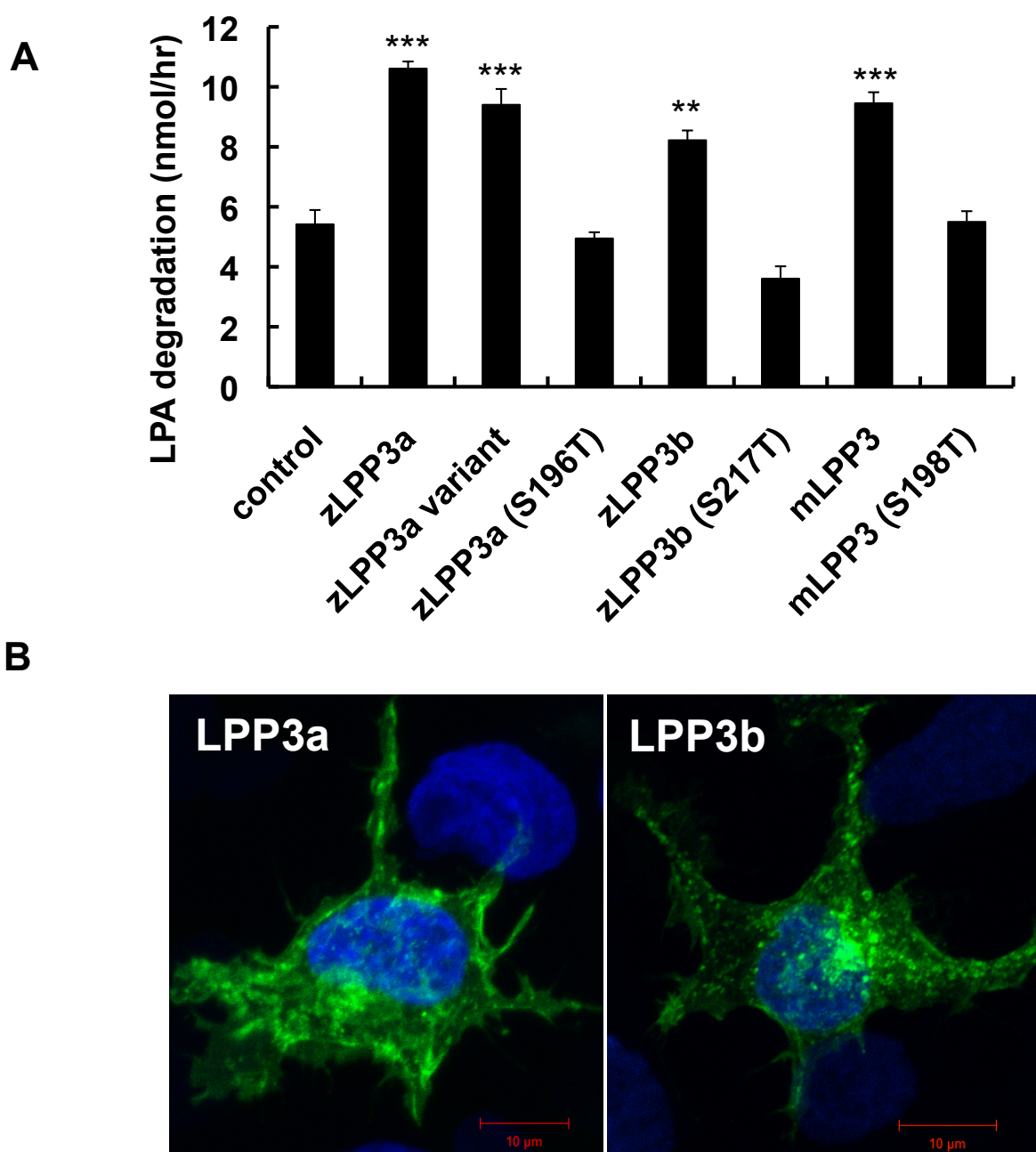


図 3-4. zLPP3はLPA分解活性を有する

A, HEK293細胞にzLPP3a, zLPP3b, mLPP3を一過的に発現させ、培養上清にLPAを添加後そのLPA分解量を測定した。 $**P<0.05$, $***P<0.01$ 。

B, zLPP3-EGFP融合タンパクをHEK293細胞に発現させて観察した。zLPP3はどちらも細胞表面にも存在する。

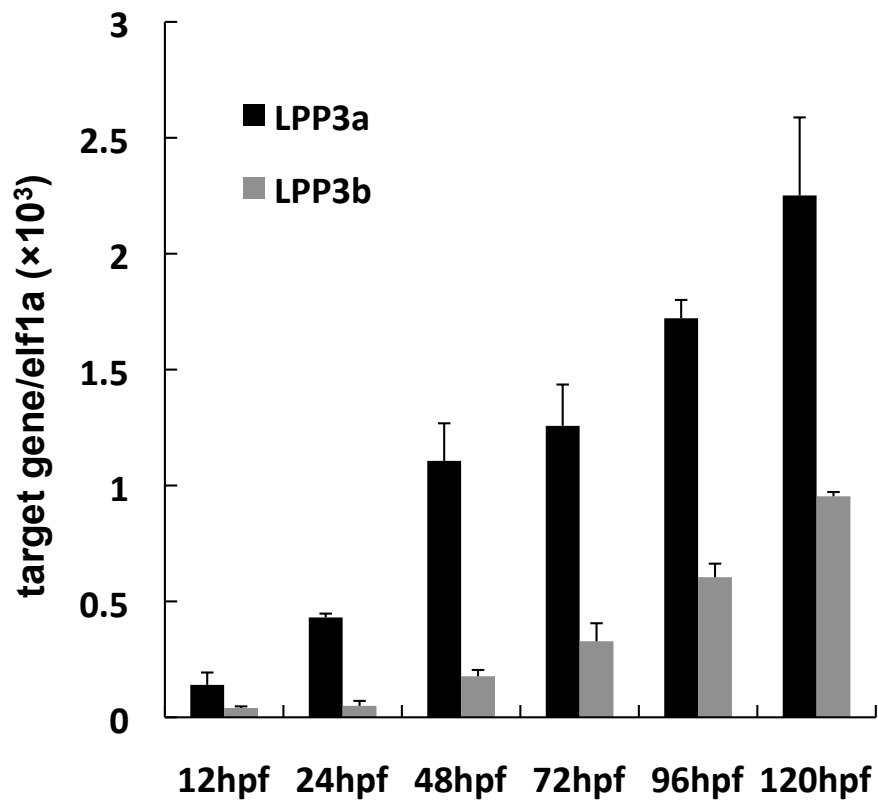


図 3-5. 各発生段階におけるLPP3a, LPP3b の発現量

血管新生が生じる時期(24-48 hpf)にはLPP3aがLPP3bより10倍程高発現している

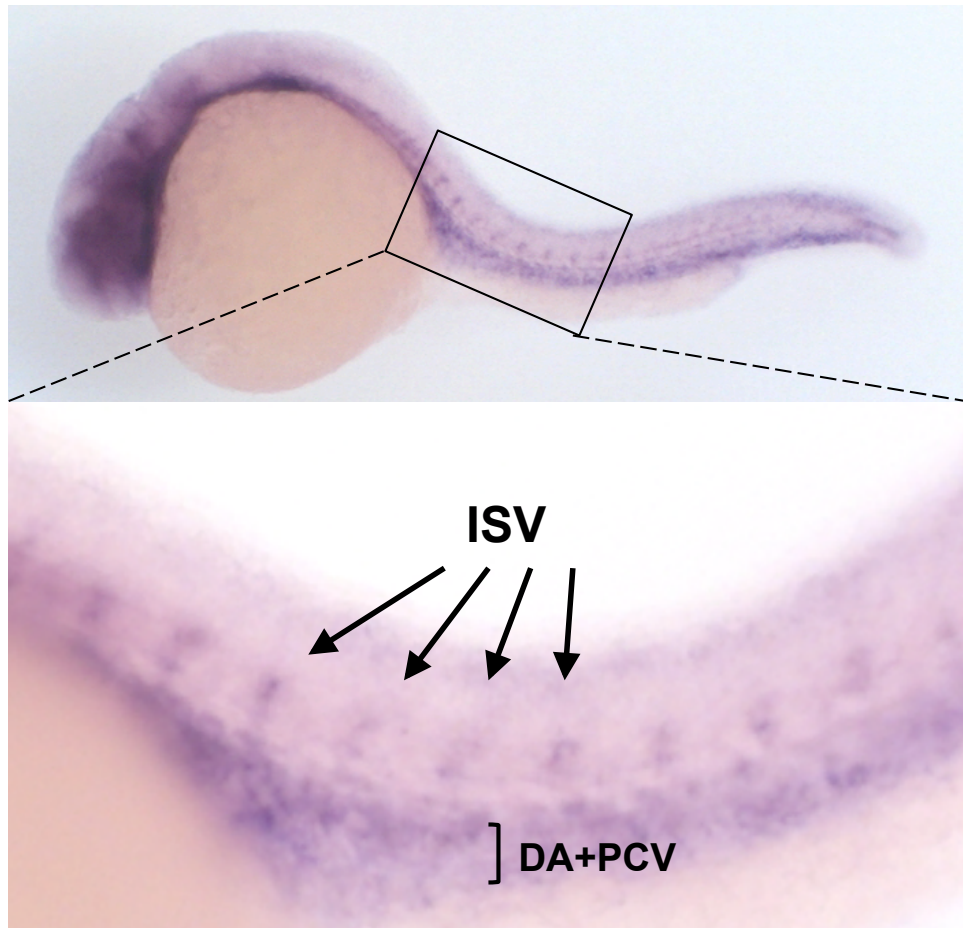


図 3-6. LPP3a の発現部位

Whole mount in situ hybridization法を用いてLPP3aの発現部位を調べた。
30 hpfではLPP3aは主に血管 (ISV, DA, PCV) に発現している

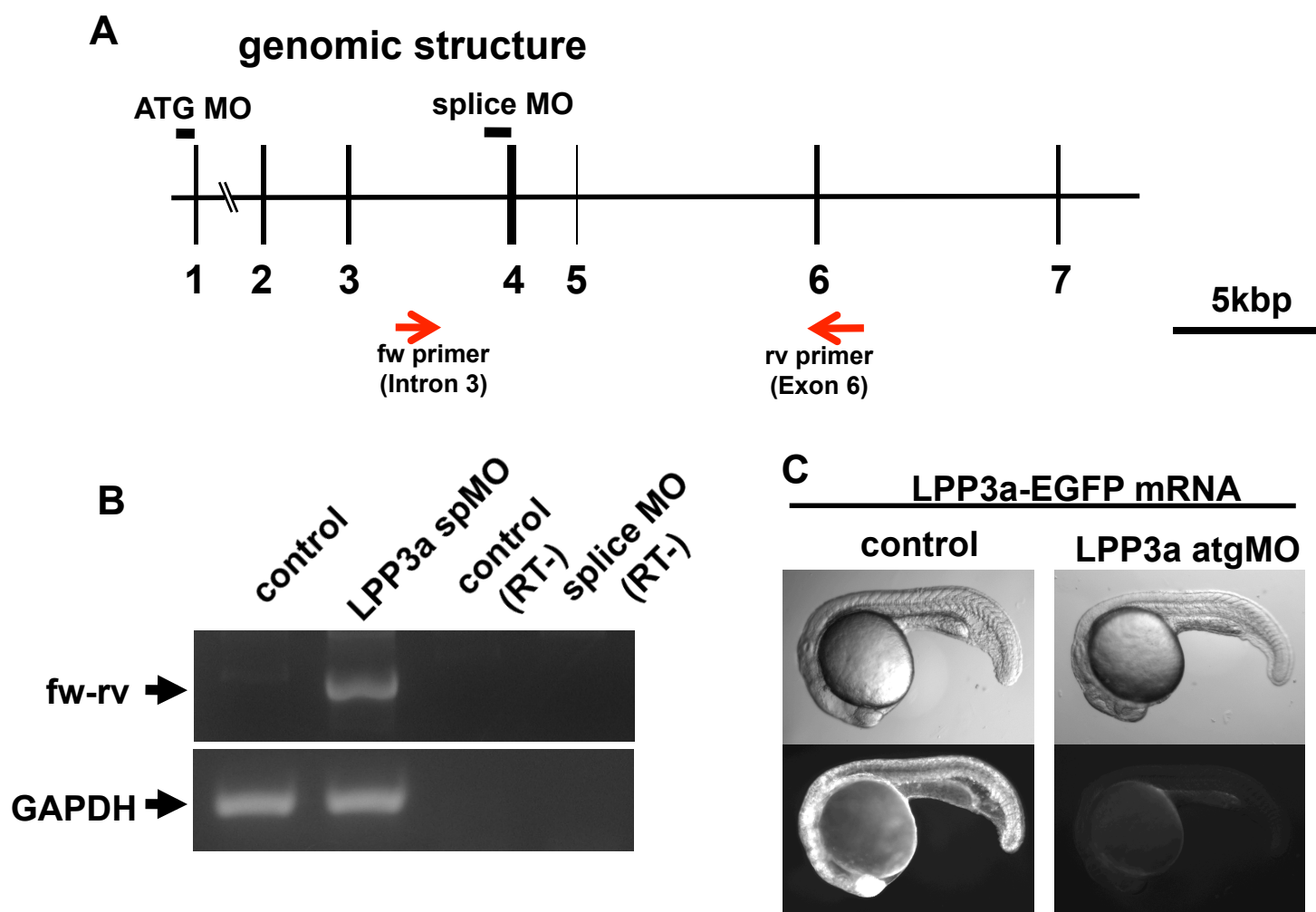


図 3-7. zLPP3a に対する MO設計

A, zLPP3aのゲノム構造とMO設計部位。

B, MOによるmRNAスプライス阻害の効果確認。

C, MOによるmRNAからの翻訳阻害の効果確認。

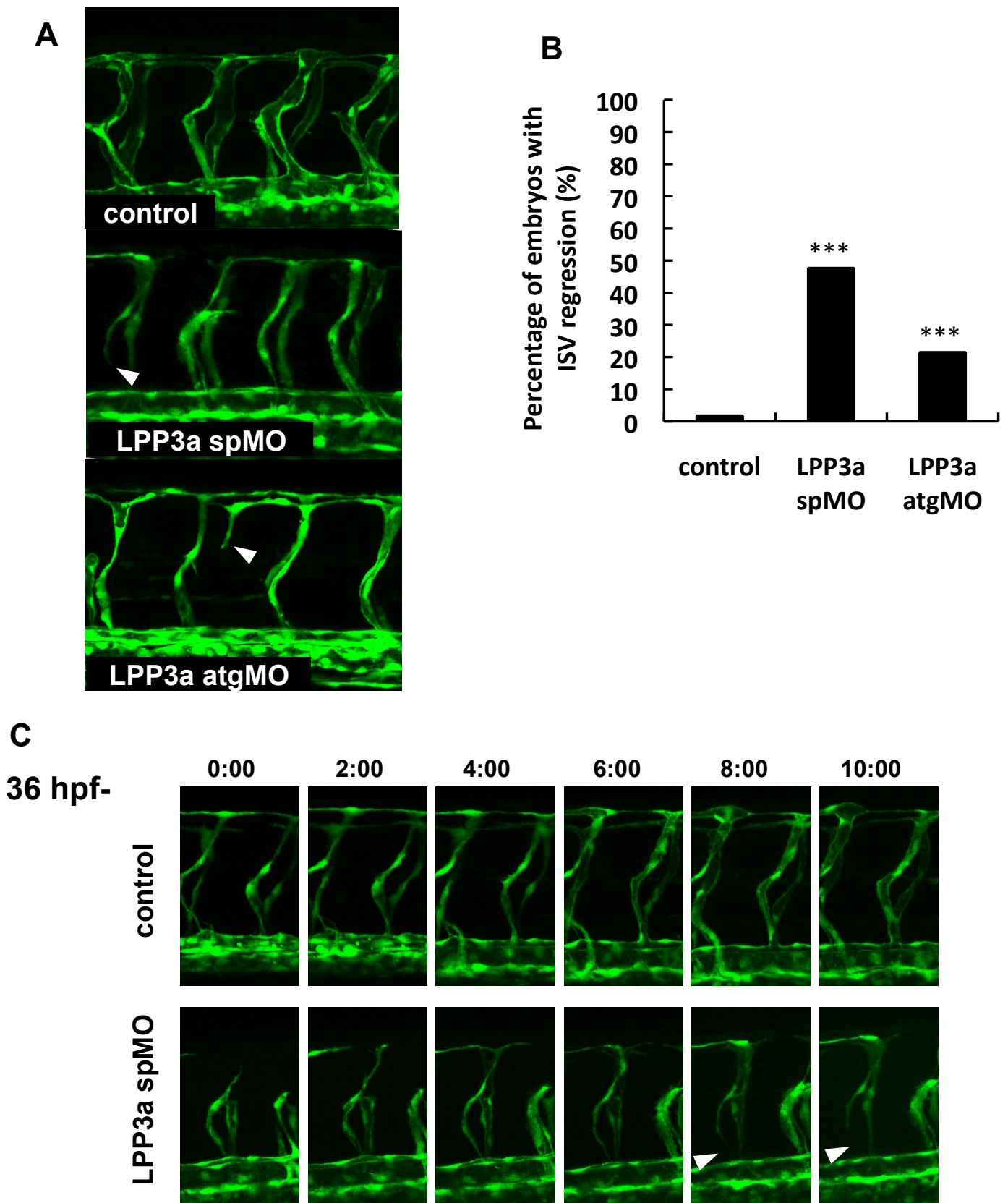


図 3-8. zLPP3a ノックダウンによる血管形成異常(48 hpf)

A, LPP3aをノックダウンすることで、血管の管腔構造が出来なくなり、動脈とISVの結合が切れてしまい退縮している(矢頭)。

B, 動脈とISVの結合が切れる(血管の退縮)表現型を示す個体の割合

C, 36 hpfから二時間おきのタイムラプス画像

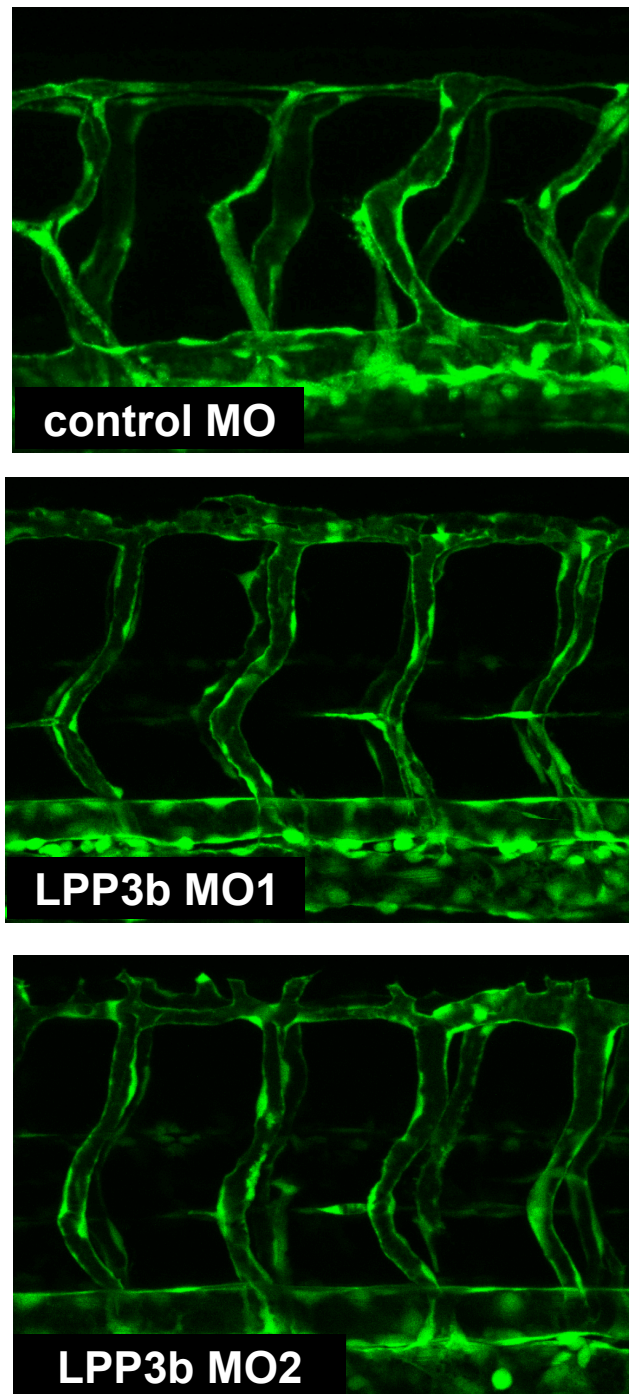


図 3-9. zLPP3b ノックダウン時の血管形成(48 hpf)

LPP3bをノックダウンしてもほとんど血管形成に影響を与えなかった。

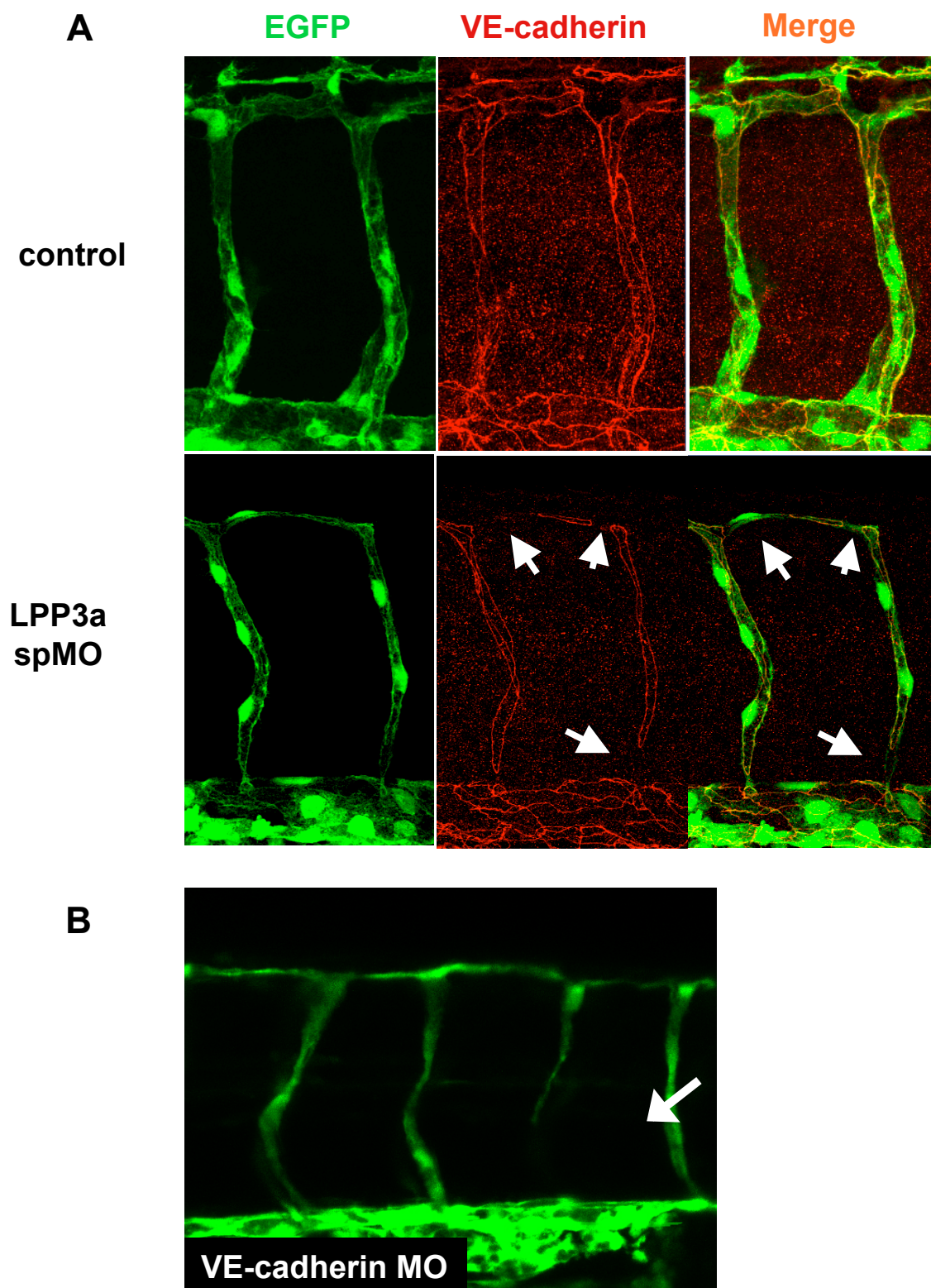
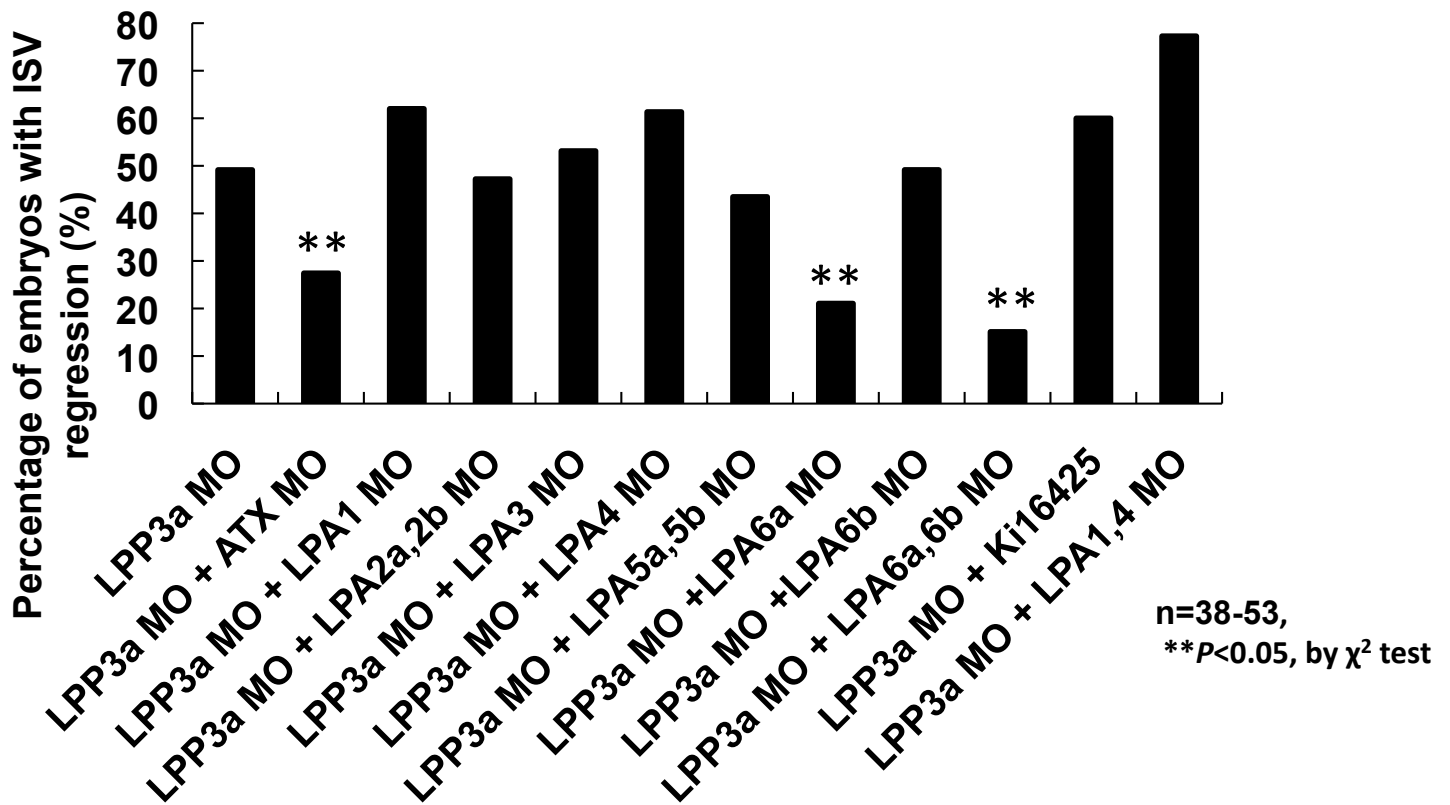


図 3-10. zLPP3a ノックダウン胚ではVE-cadherinを介した内皮細胞間接着が弱まっている。

A, LPP3aノックダウン胚では、矢印で示した部分でVE-cadherinの接着が弱まっている様子が観察される。

B, VE-cadherinをノックダウン胚では血管の退縮と管腔の未形成が観察される。

A



B

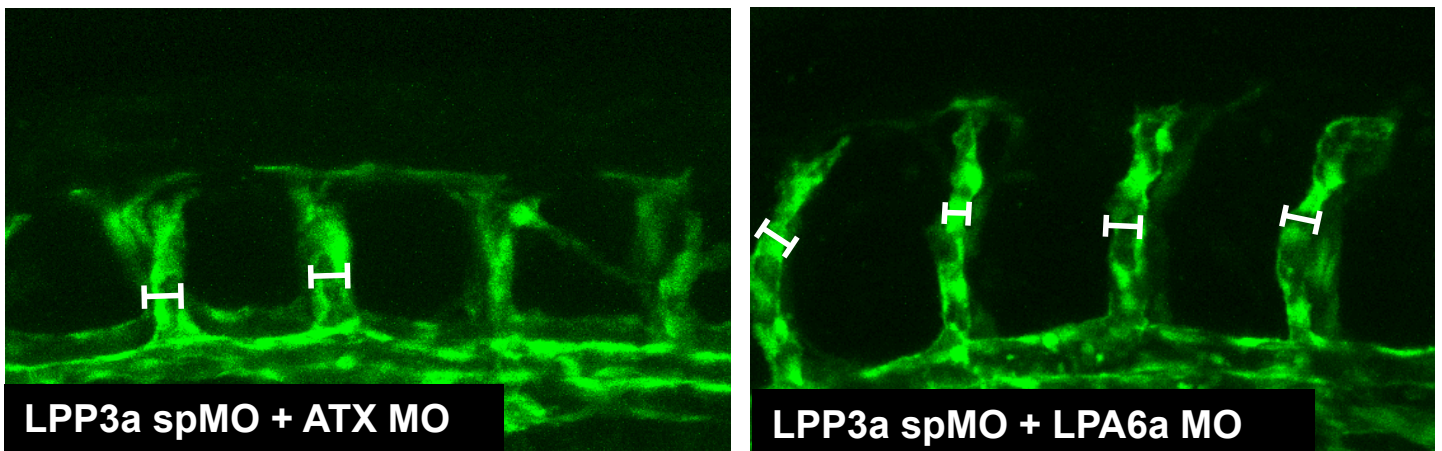


図 3-11, zLPP3a ノックダウンによる血管の退縮はLPA6a, ATXのノックダウンによりレスキューされる。

A, LPP3a ノックダウン時には血管の退縮を示す個体は約50%存在するが、ATXまたはLPA6a受容体ノックダウンにより有意に減少した。
B, LPP3aとATXまたはLPA6aをノックダウンすると血管の管腔構造が観察されるようになる。

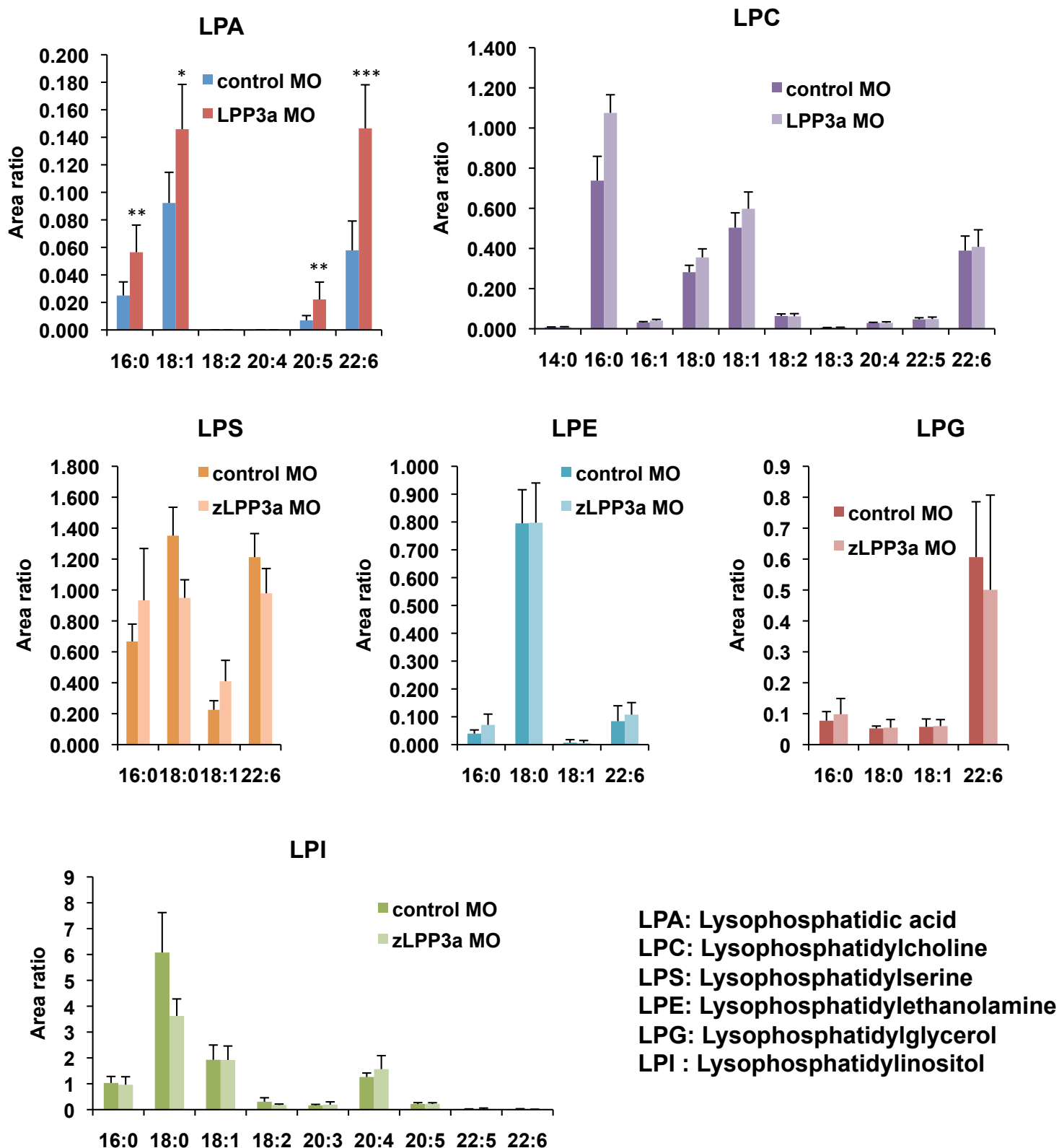


図 3-12, LPP3aをノックダウンするとゼブラフィッシュ中のLPA量が増加する (30 hpf)

LPP3aノックダウンにより体内のLPA量が増加する。他のリゾリン脂質はほとんど変化が無い。グラフの横軸はリゾリン脂質を構成している脂肪酸の種類を表している。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ by t-test

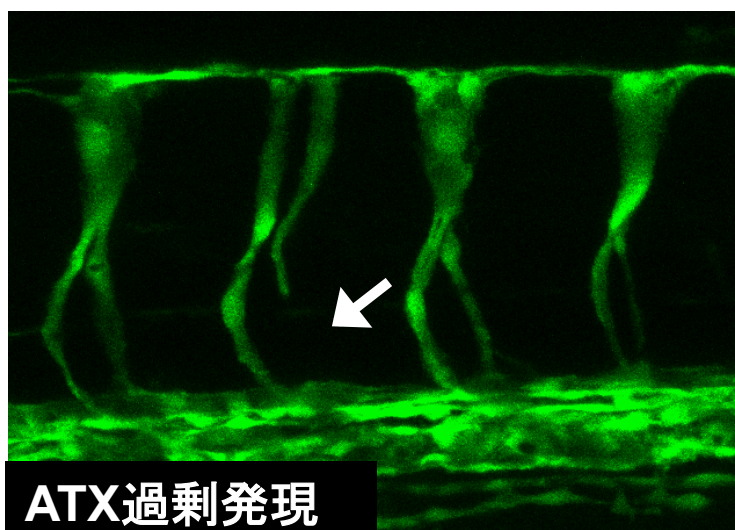
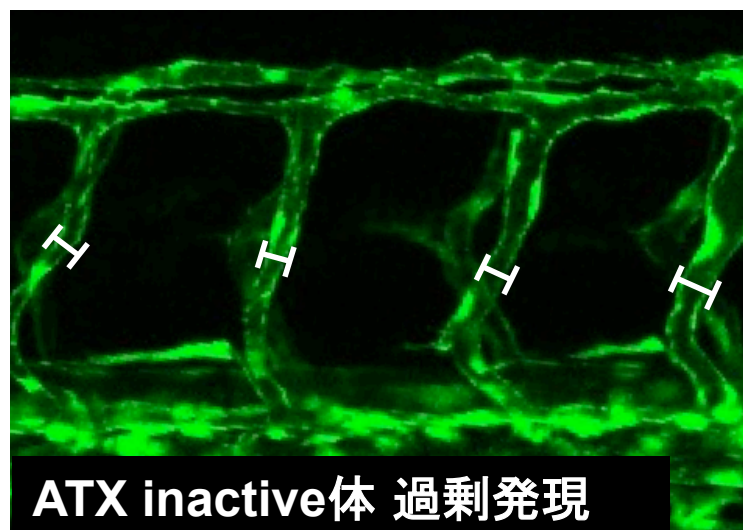


図 3-13, ATXを過剰発現させると血管の退縮、管腔の未形成を生じる。

ATXを過剰発現させると血管の管腔構造が形成されず、血管の退縮が生じる(矢印)。

第四章：

ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用
いた LPA signal と LPP3 の機能解析

第四章：ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用いた LPA signal と LPP3 の機能解析

【はじめに】

ゼブラフィッシュから LPA は血管形成に重要であり、その LPA シグナルは分解酵素である LPP3 により厳密に制御されていることがわかった。また LPA が作用するのは内皮細胞であることが予想された。これまでに *in vitro* の実験で ATX が内皮細胞の遊走を促進すること(31)や LPA が内皮細胞上の intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)の発現を増加させること(41)などが報告されている。しかしながら、LPA が内皮細胞に与える影響は完全には理解されておらず、私はヒト臍帯静脈血管内皮細胞（human umbilical vein endothelial cell, HUVEC）を用いて LPA の内皮細胞における機能解析を行った。また LPA 分解酵素である LPP3 による LPA の制御についても解析を行った。

【方法】

特に記載のない試薬は和光純薬工業より購入した。

1. 細胞

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) はクラボウから購入し、HuMedia-EG2 (クラボウ) を培地として 10 cm dish にて維持した。HUVEC は passage 4-7 までの間に実験に使用した。

HEK293 細胞は DMEM (SIGMA)、10% FCS (JSH)、2mM/ml L-glutamine (Gibco)、100 U/ml penicillin (SIGMA)、0.1 mg/ml streptomycin にて維持した。

2. HUVEC への siRNA, 遺伝子導入

HUVEC への siRNA, 遺伝子導入には Neon® Transfection System (invitrogen) を用いた。エレクトロポレーションの条件は 電圧：1400V, 時間：20 ms, 回数：1 回で行った。エレクトロポレーション後、細胞を Opti-MEM (invitrogen) に懸濁し、プレートに播種し、一時間後に HuMedia-EG2 にメディアウムを置換した。

実験に使用した siRNA は全て invitrogen から購入した。Human Stealth™ Select RNAi (Stealth Pre-designed siRNA)、3 本セット。そのうち遺伝子ノックダウン効率の高いものを定量 RT-PCR 法により確認し、使用した。使用濃度は final 50 nM。

3. *In vitro* permeability assay

Type I collagen (Cellmatrix Type I-C, 3 mg/ml, pH 3.0) を 0.02 M 酢酸で 10 分の 1 に希釈し、6.5mm Transwell® with 3.0 µm Pore Polycarbonate Membrane Insert (CORNING) の insert に 100 µL 加えた。室温で 1 時間静置し、collagen 溶液を取り除き PBS で 2 回洗浄したのち、水で 1 回洗浄し、クリーンベンチ内で乾燥させた。Transwell の下層に HuMedia-EG2 を 600 µL 加え、HUVEC を HuMedia-EG2

に 10^6 cells/ml になるように懸濁し、懸濁液 100 μ L を insert の中に加えた。その後 3 日間培養し、monolayer を形成させた。

HUVEC を 1 %BSA 入りの Medium 199 (M199, invitrogen) で洗浄し、一時間 serum starvation を行った。その後 insert から 10 μ L のメディウムを除き、10 倍濃度の LPA を加え、30 分、37°C でインキュベーションした。1 mg/ml の FITC-dextran (MW: 42,000, ICN) を 10 μ L 加え、軽く振って攪拌した。1 時間後、下層に移動してきた FITC-dextran を測定するため、下層から回収した 50 μ L の液に 300 μ L の PBS を加え希釈し、FlexStation 3 (Molecular Devices) を用いて FITC の蛍光を測定した (492 nm で励起し、520 nm の蛍光を検出)。

4. 免疫蛍光染色

24 well plate (Greiner) に丸型カバーガラス (Cat.No. 12-545-82, Thermo Fisher Scientific) を入れ、Type I collagen を 0.02 M 酢酸で 10 分の 1 に希釈し、室温で 1 時間コートした。HUVEC を HuMedia-EG2 で 2×10^5 cells/ml になるように懸濁し、各 well に 1 mL ずつ入れた。2 日間培養したのち、細胞を 0.1% BSA-M199 で洗い、0.1% BSA-M199 で 1 時間 serum starvation を行った。その後、LPA, forskolin (FK) などで刺激し、30 分後 4% PFA-PBS, 5mM CaCl_2 を用いて室温で 15 分間固定した。0.5% Triton-TBS, 5 mM CaCl_2 (TBSCa) で 15 分、室温で処理し、TBSCa で洗浄した。3% BSA-TBSCa, 10% goat serum にて 30 分室温でブロッキング後、一次抗体をブロッキング液で希釈し、4°C O/N で処理した。一次抗体で使った抗体と希釈濃度は、抗 VE-cadherin 抗体 (clone BV6, 1/200)、抗 Flag 抗体 (M2, 1/200) である。二次抗体には Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse IgG (Molecular Probes) を 1/1000 希釈で使用し、1 時間室温で処理した。核染色をする際には 100 ng/ml の DAPI を、アクチンフィラメント染色を行う際には Alexa Fluor 594 phalloidin (Molecular Probes) を 1/50 希釈で二次抗体液に添加した。二

次抗体処理後 TBSCa で洗浄し、カバーガラスを Fluoroshield Mounting Medium (ImmunoBioScience) にてスライドガラスへマウントし、LSM 700 confocal laser-scanning microscope (Carl Zeiss) を使用し、観察した。

5. Scratch assay

24 well plate に HUVEC を播種し、コンフルエントまで培養し、0.1% BSA-M199 で洗い、0.1% BSA-M199 で 1 時間 serum starvation を行った。その後、P20 チップを用いてスクラッチし、メディウムを交換し、FK で 30 分間刺激した。その後、LPA で刺激し、30 分後に固定し、免疫染色を行った。方法は上記の免疫蛍光染色と同じである。

6. VE-cadherin 細胞外ドメイン組み換えタンパク質 (VE-cad-Fc-His) の作製

プラスミド (VE-cadherin-Fc-His-pcDNA3.1) (42) は国立循環器センターの望月直樹先生より頂いた。これを 10 cm dish に播種した HEK293 細胞に Lipofectoamine 2000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。24 時間後、細胞を PBS で wash し、メディウムを Opti-MEM に置換した。48 時間後に上清を回収し、12000 G, 4°C で 15 分遠心し、0.45 μm のフィルター (Millex-HV) で濾過した。その上清を HiTrap Protein G HP (GE Healthcare) を用いて精製した。SDS-PAGE と CBB 染色により、目的のタンパク質が含まれているフラクションを確認・回収後、PBS/CaMg (PBS, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2) にて透析した。BCA 法により濃度を測定後、-80°C で保存した。

7. VE-cadherin 接着アッセイ (42)

VE-cad-Fc-His を PBS/CaMg で 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製し、50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で 96 well plate に加え、4°C O/N でコートした。PBS/CaMg で洗浄した後、1% heat-inactivated BSA

(85°C, 12 分処理) -PBS にて一時間ブロッキングした。これを PBS/CaMg で一度洗浄したものをアッセイに使用した。

10 cm dish でサブコンフルエントまで培養した HUVEC を PBS で洗浄し、7 ml の 2 μ M CellTracker Green CMFDA (Invitrogen)-PBS/CaMg にて 37°C で 45 分間培養して蛍光標識した。0.1% BSA-M199 に置換し、30 分間培養した後、0.05% Trypsin, 0.53 mM EDTA により細胞を剥がし、0.2mg/ml Trypsin inhibitor で中和し、細胞数を計測した。PBS wash 後に $0.8-1.6 \times 10^5$ cells/ml になるように 0.1% BSA-M199 で懸濁し、37°C で 30 分間、湯浴にてインキュベーションした。2 倍濃度のリガンド (50 μ L) を入れた 96 well plate に細胞懸濁液を 50 μ L 加え、一時間インキュベートしたのち、未接着の細胞を PBS/CaMg で wash することで取り除いた。接着した細胞を 1% Triton-PBS で溶解し、蛍光強度を FlexStation 3 を用いて測定した

8. 定量 PCR による遺伝子発現解析

mRNA の抽出や逆転写、定量 PCR は第三章の通り。House-keeping gene には GAPDH を使い、GAPDH のコピー数で補正を行った。プライマーの配列は以下の通りである。

GAPDH

Fwd: 5'-GCCAAGGTCATCCATGACAACT-3'

Rev: 5'-GAGGGGCCATCCACAGTCTT-3'

LPA₁

Fwd: 5'-GAGGAATCGGGACACCATGAT-3'

Rev: 5'-ACATCCAGCAATAACAAGACCAATC-3'

LPA₂

Fwd: 5'-GACCACACTCAGCCTAGTCAAGAC-3'

Rev: 5'-CTTACAGTCCAGGCCATCCA-3'

LPA₃

Fwd: 5'-GCTCCCATGAAGCTAATGAAGACA-3'

Rev: 5'-AGGCCGTCCAGCAGCAGA-3'

LPA₄

Fwd: 5'-CAGTGCCTCCCTGTTTGTCTTC-3'

Rev: 5'-GAGAGGGCCAGGTTGGTGAT-3'

LPA₅

Fwd: 5'-AGCAACACGGAGCACAGGTC-3'

Rev: 5'-CCAAAACAAGCAGAGGGAGGT-3'

LPA₆

Fwd: 5'-CCGCCGTTTTTGTTTCAGTC-3'

Rev: 5'-GAGATATGTTTTCCATGTGGCTTC-3'

LPP1

Fwd: 5'-CTGGAGCGATGTGTTGACTG-3'

Rev: 5'-GTTGGTGTTTCATGCAGAGTTG -3';

LPP2

Fwd: 5'-CTACCGTCCAGATACCATCACC-3'

Rev: 5'-GTTGAAGTCCGAGCGAGAATAG-3'

LPP3

Fwd: 5'-TGGCAGGATTTGCTCAAGG-3'

Rev: 5'-CAATAATGTCCACAGGTGAAAGGG-3'

HEY1

Fwd: 5'-GAGAAGCAGGGATCTGCTAA-3'

Rev: 5'-CCCAAAGTCCGATAGTCCAT-3'

9. Notch ligand (Dll4) 刺激による遺伝子発現変化の解析

Notch ligand である recombinant Dll4 (rDll4, R&D Systems) を PBS で 1 µg/ml に希釈し、6 well plate を 4°C O/N でコートした。PBS で wash 後、HUVEC を 1×10^5 cells/well で播種し、HuMedia-EG2 で培養した。そのとき同時に Notch inhibitor である DAPT (10 µM, Sigma) を処理する群も用意した。24 時間後に HUVEC から RNA を抽出し、遺伝子発現解析を行った。

10. TGFα shedding assay による GPCR 活性化の検出 (43)

HEK293 細胞を 12 well に播種し、翌日 LIPOFECTOAMINE 2000 で LPA 受容体、platelet activating factor (PAF) 受容体、LPP3 とアルカリホスファターゼ (AP) 標識 TGFα (AP-TGFα) をそれぞれ組み合わせてトランスフェクションした。24 時間後、細胞を剥がし、HBSS (Hank's balanced salt solution (with 5 mM HEPES (pH 7.4), without phenol red)) に懸濁し、96 well plate に 90 µL/well でまき、37°C で 30 分間インキュベートした。目的の 10 倍濃度に調製した LPA または PAF を 10 µL/well で加えてさらに 1 時間インキュベートした。そして、細胞から切りだされて培養上清に移行した AP-TGFα 量は AP 活性を測定することで定量した。AP 活性は pNPP (p-Nitrophenyl Phosphate) を基質して、遊離されるパラニトロフェノールの吸光度 (OD420) を測定することで定量した。

【結果】

1. LPA は内皮細胞のアクチンストレスファイバー形成を促進し、血管透過性を高める

まず LPA の作用を調べるために、コンフルエントまで培養した HUVEC を LPA 刺激し、様子を観察した。LPA 刺激した際に HUVEC の形態が変化している様子が見られたので、細胞骨格であるアクチンを染色したところ、通常時には細胞の周りに張り巡らされているアクチン繊維が LPA 刺激時には細胞内を横断するアクチンストレスファイバーの形成が促進された (図 4-1 A)。さらに細胞同士の接着がなくなり、ギャップが形成されていたので血管内皮細胞同士の接着に重要な VE-cadherin を免疫染色により可視化した。その結果、通常、細胞接着面に存在する VE-cadherin が LPA 刺激によりその局在が変化していることがわかった (図 4-1 A)。このことから LPA により内皮細胞間接着が抑制されていることが示唆されたので、Transwell を用いて血管透過性を評価したところ、LPA は血管透過性を亢進させることが明らかとなった (図 4-1 B)。

2. LPA は VE-cadherin 依存的な接着を抑制する

LPA が VE-cadherin による細胞間接着を抑制するかどうかをより直接的に調べるために VE-cadherin 接着アッセイを行った。このアッセイは VE-cadherin の細胞外領域と抗体の Fc 領域を融合させたタンパクを well にコートし、そこに内皮細胞を接着させることで VE-cadherin 依存的な接着を評価する方法である(42)。このアッセイの結果から、LPA は VE-cadherin 依存的な接着を抑制することがわかった (図 4-2)。

3. 内皮細胞に対する LPA の効果は $G\alpha_{13}$ /RhoA/ROCK pathway を介する

LPA の内皮細胞間接着抑制作用は細胞内のこういったシグナルを介しているのかを調べた。GPCR の下流でアクチンストレスファイバー形成を促進する経路として $G\alpha_{13}$ /RhoA/ROCK 経路が報告されていたので(44)、LPA もこの経路を介しているのかを調べた。その結果、 $G\alpha_{13}$ /RhoA/ROCK 経路の阻害により、LPA によるアクチンストレスファイバー形成は抑制された (図 4-3)。VE-cadherin 接着アッセイにおいても LPA の接着抑制作用は ROCK の阻害により減弱した (図 4-4)。

4. 内皮細胞に対する LPA の効果は LPA_6 を介する

LPA の作用がどの LPA 受容体を介しているのかを調べるために、HUVEC 上の LPA 受容体の発現を調べたところ、 LPA_6 が他の受容体に比べ高発現していることがわかった (図 4-5 A)。そこで、siRNA を用いて LPA_6 をノックダウンし、HUVEC を LPA 刺激したところ、LPA によるアクチンストレスファイバー形成、血管透過性亢進作用や VE-cadherin 依存的な接着抑制作用が全て減弱した (図 4-5 B, 6, 7, 8)。このことから HUVEC において LPA の作用は主に LPA_6 を介していることが明らかとなった。ここまでの結果から LPA は $LPA_6/G\alpha_{13}$ /RhoA/ROCK 経路を活性化し、アクチンストレスファイバー形成を促進することで VE-cadherin の局在を変化させ、内皮細胞間接着を抑制していることが想定される (図 4-9, 10)。

5. LPP3 は LPA シグナルを抑制する

次に、LPP3 が HUVEC において LPA シグナルをどのように制御しているのかを調べた。まず HUVEC における LPP family の発現量を解析したところ LPP family のなかでは LPP3 が高発現していた (図 4-11 A)。HUVEC に LPP3 に対

する siRNA をトランスフェクションしたところ、LPP3 の発現量は減少し、HUVEC の LPA 分解活性は減少することを確認できた (図 4-11 B, 12)。通常時では 1 μ M LPA からアクチンストレスファイバー形成促進作用が観察されるが、この siRNA を用いて LPP3 をノックダウンしたところ 10 分の 1 の濃度である 0.1 μ M LPA でアクチンストレスファイバー形成促進作用が見られた (図 4-13)。LPP3 ノックダウンによる LPA 高感受性は mouse LPP3 (mLPP3)を導入することや LPA₆ をノックダウンすることで見られなくなった (図 4-13)。VE-cadherin 接着アッセイにおいても LPP3 ノックダウンによって LPA への感受性が亢進した (図 4-14)。LPP3 による LPA₆ 活性化抑制はどの程度なのかを定量的に調べるために GPCR 活性化を検出する TGF α shedding assay(43)を行った。LPA₆ を HEK293 細胞に一過的に発現させ、LPA 刺激すると濃度依存的に LPA₆ の活性化を検出することができた (図 4-15)。そして LPA₆ と同時に LPP3 を発現させると LPA₆ の LPA への反応性は単独で発現させた時に比べ 100 分の 1 程度まで低下した (図 4-15)。この作用は LPA 分解活性がない不活性型の LPP3 では見られなかった (図 4-15)。また LPP3 によって分解を受けない platelet activating factor (PAF)による PAFR の活性化に LPP3 は影響を与えなかった (図 4-15)。ここまでの結果から、通常時 LPP3 は LPA₆ へのシグナルを抑制することで、血管内皮細胞同士の接着を安定に保っているが、LPP3 をノックダウンすると LPA₆ が活性化しやすくなり、低濃度の LPA によって細胞間接着が弱まることが想定された (図 4-16)。

6. 細胞密度・細胞接着の強さによって LPA に対する感受性が変化する

HUVEC を用いた実験を行っている中で、HUVEC の細胞密度によって LPA に対する感受性が変化する事がわかってきた。コンフルエント時には、1 μ M LPA からアクチンストレスファイバー形成が見られるが、サブコンフルエント時に

はより低濃度の 0.1 μ M LPA 刺激でアクチンストレスファイバーが形成された (図 4-17)。この LPA に対する感受性の違いは、細胞間接着の程度に依存するのではないかと考え、コンフルエントの HUVEC に細胞間接着を強める forskolin (FK) を処理し(45)、LPA 刺激したところ LPA によるアクチンストレスファイバー形成は生じなかった (図 4-17)。FK 処理によって LPA シグナルが抑制されたが、この現象に LPP3 が関与しているか調べるため、LPP3 をノックダウンした HUVEC に対し FK を処理し LPA 刺激を行った。その結果、FK 処理を行っても LPP3 をノックダウンしていれば LPA 刺激によりアクチンストレスファイバーが形成されることがわかった (図 4-17)。この結果から、FK 処理によって LPP3 の機能が亢進し、LPA シグナルが抑制されることが示唆された。

7. 細胞間接着面に LPP3 が局在し、LPA シグナルを抑制している

LPP3 の細胞内局在を調べるために Flag タグで標識した LPP3 を HUVEC に一過的に発現させ、観察した。サブコンフルエント、コンフルエント、FK 処理時の各条件で LPP3 の細胞内局在を調べたところ、サブコンフルエント時には LPP3 は細胞全体に存在していた。コンフルエント時には一部細胞間接着部位に局在している様子が観察され、FK 処理時には LPP3 は顕著に細胞間接着部位に局在している様子が観察された (図 4-18 A)。LPP3 が細胞間接着部位に局在するのかを確かめるため、スクラッチアッセイを行った。スクラッチアッセイではコンフルエントまで培養した HUVEC の monolayer をチップでひっかく事で傷を作り、ひとつの細胞の中で接着面と非接着面を作り出せる。FK 処理したあとに HUVEC をスクラッチし、LPP3 の発現部位を調べたところ、LPP3 はやはり細胞接着面に局在しており、スクラッチして細胞がいなくなった面では LPP3 の局在が観察されなかった (図 4-18 B)。

細胞の非接着面には LPP3 が局在していないことがわかったので、このときに

LPA 刺激するとどうなるかを調べた。結果、LPA 刺激により細胞の非接着面においてアクチンストレスファイバー形成が見られ、細胞が接着している部分ではほとんど LPA による作用は見られなかった (図 4-19)。この LPA による非接着面でのアクチンストレスファイバー形成も $\text{LPA}_6/\text{G}\alpha_{13}/\text{RhoA}/\text{ROCK}$ 経路を介していた (図 4-19)。ここまでの知見から細胞の非接着面では LPP3 が局在していないため LPA シグナルが入りやすく、接着面では LPP3 が局在しているため LPA シグナルが抑制されていることが想定される。そこで LPP3 によって分解を受けない LPP 耐性の LPA アナログである OMPT(46)で HUVEC を刺激したところ、OMPT 刺激では細胞全体に渡ってアクチンストレスファイバー形成が促進された (図 4-20)。また LPA と同様に $\text{G}\alpha_{13}/\text{RhoA}/\text{ROCK}$ 経路を活性化する thrombin で刺激しても細胞全体に渡ってアクチンストレスファイバーが形成された (図 4-20)。このことから、LPA 刺激によって非接着面特異的にアクチンストレスファイバーが形成されるのは LPP3 の局在が重要であることが強く示唆された。

8. LPP3 の発現量は Notch signal によって制御されている

サブコンフルエント、コンフルエント、FK 処理時の各条件で LPP3 の発現量を定量したところ、FK 処理時 LPP3 の発現量がサブコンフルエント時に比べ約 8 倍程度増加することがわかった (図 4-21)。この FK 処理による LPP3 の発現量増加に関して、私は Notch 経路が関与しているのではないかと考えた。Notch は一回膜貫通型受容体であり、膜タンパクである Notch ligand と結合すると、細胞内ドメインが切りだされ、遊離し、標的遺伝子の転写を制御することが知られている(47)。内皮細胞は Notch ligand と Notch をどちらも発現しており、接着することでシグナルを伝えることができる。そこで FK 処理した HUVEC に対して Notch シグナルの阻害剤である DAPT を処理したところ、LPP3 の発現量が低

下した (図 4-22 A)。次に Notch ligand の一つである Dll4 で HUVEC を刺激したところ LPP3 の発現量は増加し、DAPT 処理により LPP3 の発現増加は阻害された (図 4-22 B)。これらのことから LPP3 の発現量は Notch シグナルによって一部制御されていることがわかった。

【考察】

HUVEC を用いた解析から、LPA は $\text{LPA}_6/\text{G}\alpha_{13}/\text{RhoA}/\text{ROCK}$ 経路を活性化し、アクチンストレスファイバー形成を促進することで VE-cadherin の局在を変化させ、内皮細胞間接着を抑制していることが想定された。また HUVEC には LPA 分解酵素である LPP3 が発現しており、LPA シグナルを抑制していることもわかった。HUVEC では LPP3 をノックダウンした場合、 LPA_6 が活性化しやすくなり低濃度の LPA により細胞間接着抑制作用が見られた。ゼブラフィッシュでは LPP3 をノックダウンすることで、 LPA_6 が過剰に活性化し、血管内皮細胞同士の結合が切れて退縮する様子が観察され、VE-cadherin による接着も弱まっていたがこの表現型は HUVEC で得られた知見と一致する。つまりゼブラフィッシュでも LPP3 ノックダウンにより $\text{LPA}_6/\text{G}\alpha_{13}/\text{RhoA}/\text{ROCK}$ 経路が過剰に活性化してしまったために血管形成異常を示したのではないかと考えられる。

また興味深い知見として、LPA は細胞の非接着面において強くシグナルを伝えることがわかった。この LPA の限局した作用は分解酵素である LPP3 の局在によって制御されることが強く示唆される。第三章のはじめに述べたが、LPA はその基質である LPC と産生酵素である ATX が細胞外に豊富に存在するため、一見細胞外で無制御に産生されるように思える。しかし、今回の研究から細胞外で産生された LPA は LPA 受容体がある部位ならどこでも作用するわけではなく、その作用する部位は LPP3 によって制御されていることがわかった。LPP3 の発現制御メカニズムには二つあり、一つは細胞内局在による制御である。これは細胞接着面に LPP3 を局在させることで、細胞間接着を作っている細胞には LPA シグナルを入れさせないようにしている。もう一つは Notch シグナルによる LPP3 の発現量の制御である。

ところで、ゼブラフィッシュにおいて受精後 30 時間の伸長している体節間血

管には2種類の内皮細胞が存在していることが知られている(図 4-23)。先端の細胞は Tip cell と呼ばれ、長いフィロポディアを伸ばし、血管新生因子などに向かって遊走していくことがわかっている。この Tip cell につらなって移動して行く細胞を Stalk cell と呼ぶ。この細胞は Tip cell と異なり、細胞増殖し、管腔を形成し、アドヘレンスジャンクションを介して強固に接着することが知られている。このように伸長している内皮細胞には性質の異なる二つの内皮細胞が存在しているが、この性質の違いを創り出すのには Notch シグナルが重要である。Tip cell は Notch ligand である Dll4 を高発現しており、Tip cell につらなる内皮細胞に Notch を介してシグナルを伝えることでその細胞が Stalk cell に分化する(47)。つまり、Notch シグナルは遺伝子の転写制御を介して強固な接着や管腔形成を促進させることが知られている(図 4-23)。本研究で明らかになった LPP3 が LPA を分解することで内皮細胞間の接着を強固にしていることや Notch シグナルによって LPP3 の発現が増加することを考えると、今まで知られていた Notch シグナルによる内皮細胞の Stalk cell への形質変化に LPP3 の発現上昇が寄与している可能性が考えられる。

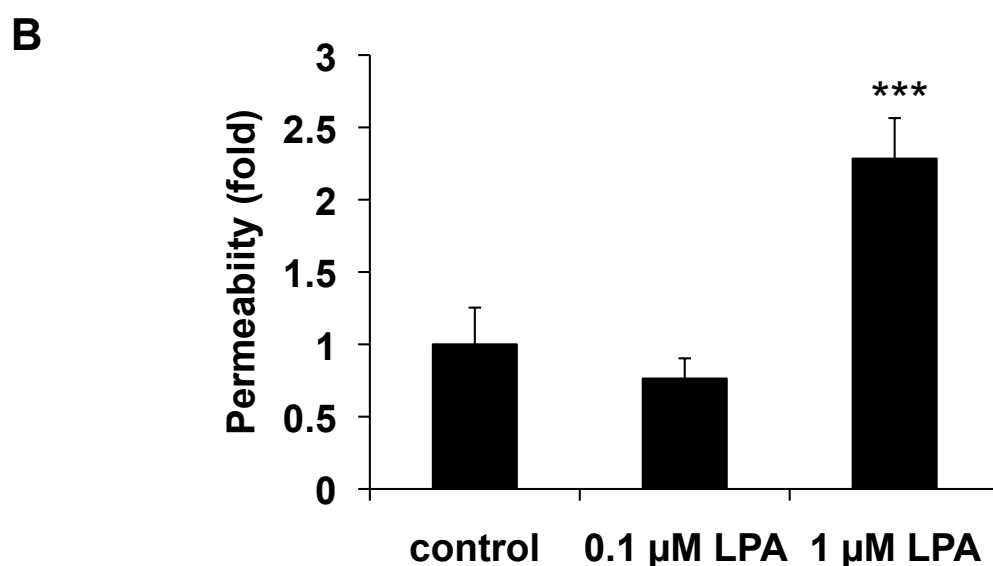
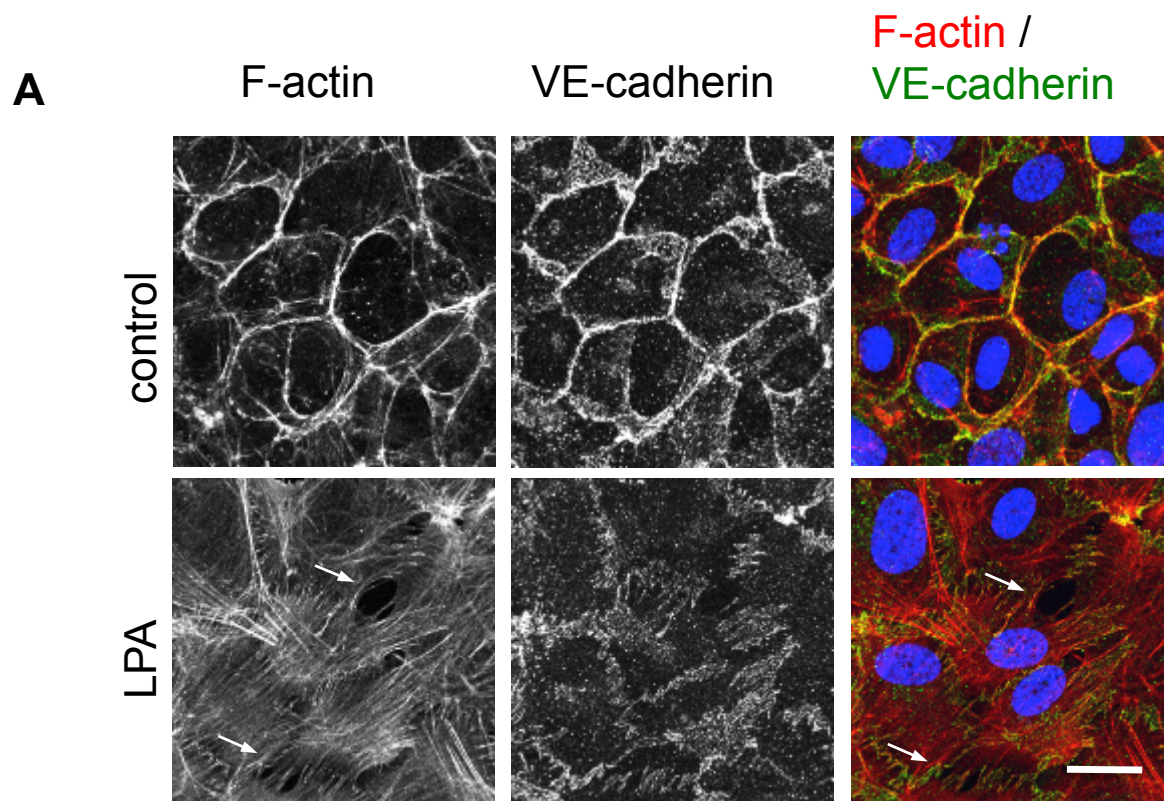


図 4-1, LPA刺激によってアクチンストレスファイバー形成が促進され、血管透過性が亢進する。

A, controlではアクチンは細胞接着面に局在しているがLPA刺激により細胞内を横断するようなアクチンストレスファイバーを形成する。またLPA刺激によりVE-cadherinの局在が変化し、細胞間にギャップができる(矢印)。Scale bar : 20 μ m。

B, Transwellを用いた血管透過性アッセイ。LPA刺激により血管透過性が亢進する。*** $p < 0.001$ 。

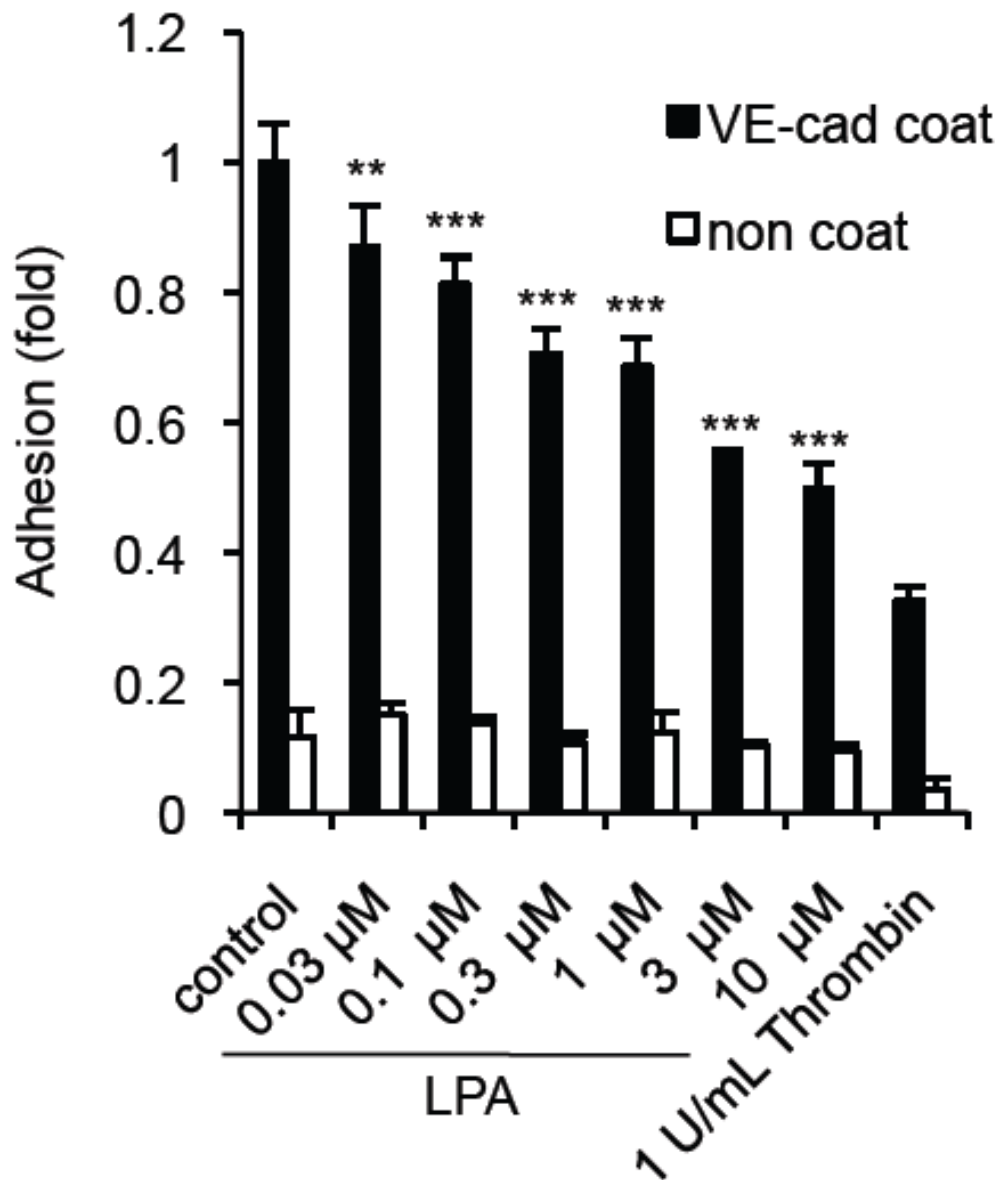


図 4-2, LPA刺激によりVE-cadherin依存的な接着が抑制される
 VE-cadherin接着アッセイ。LPA濃度依存的にVE-cadherin依存的な接着が抑制された。Thrombinはpositive controlとして使用した。** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

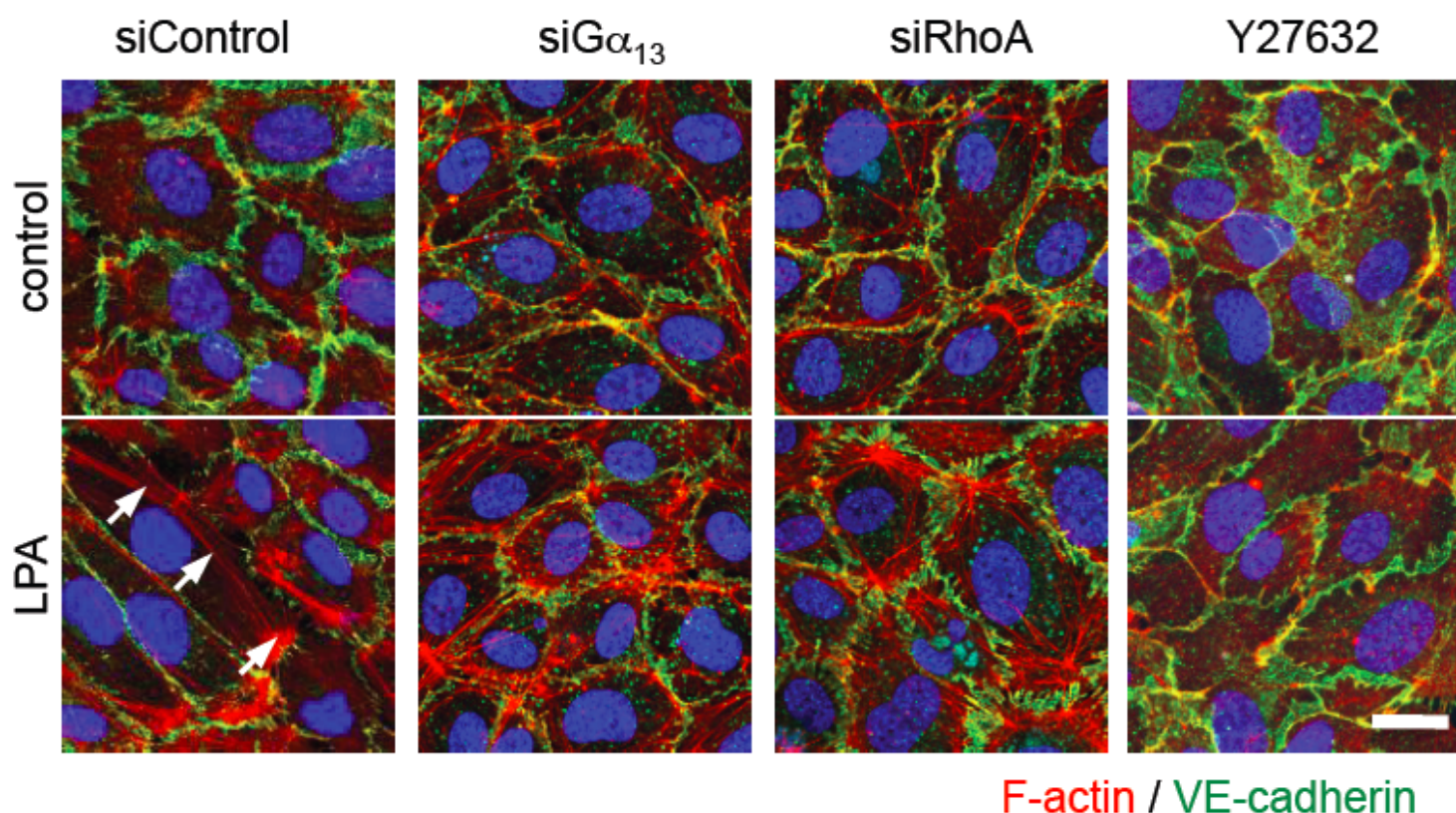


図 4-3, LPAはG α_{13} /RhoA/ROCK経路を介してアクチンストレスファイバー形成が促進する。

LPA刺激によりVE-cadherinの局在が変化し、細胞間にギャップができる(矢印)が、siRNAによりG α_{13} またはRhoAをノックダウンするとLPAの効果が減弱する。またROCK inhibitorであるY27632の前処理によってもLPAの効果が減弱する。Scale bar : 20 μ m。

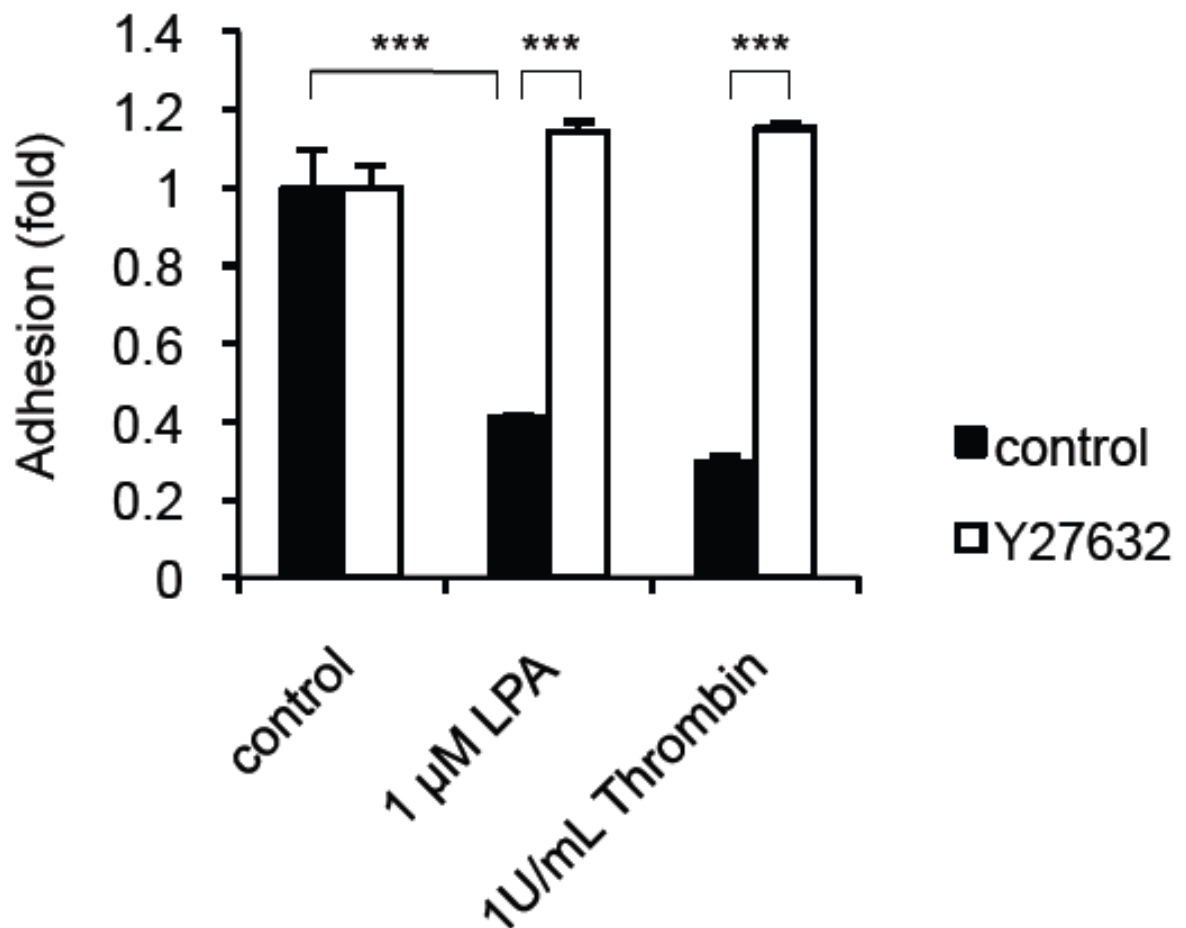


図 4-4, LPA刺激によるVE-cadherin依存的な接着抑制はROCKを介するVE-cadherin接着アッセイ。LPAの効果がY27632の前処理により減弱する。
*** $P < 0.001$ 。

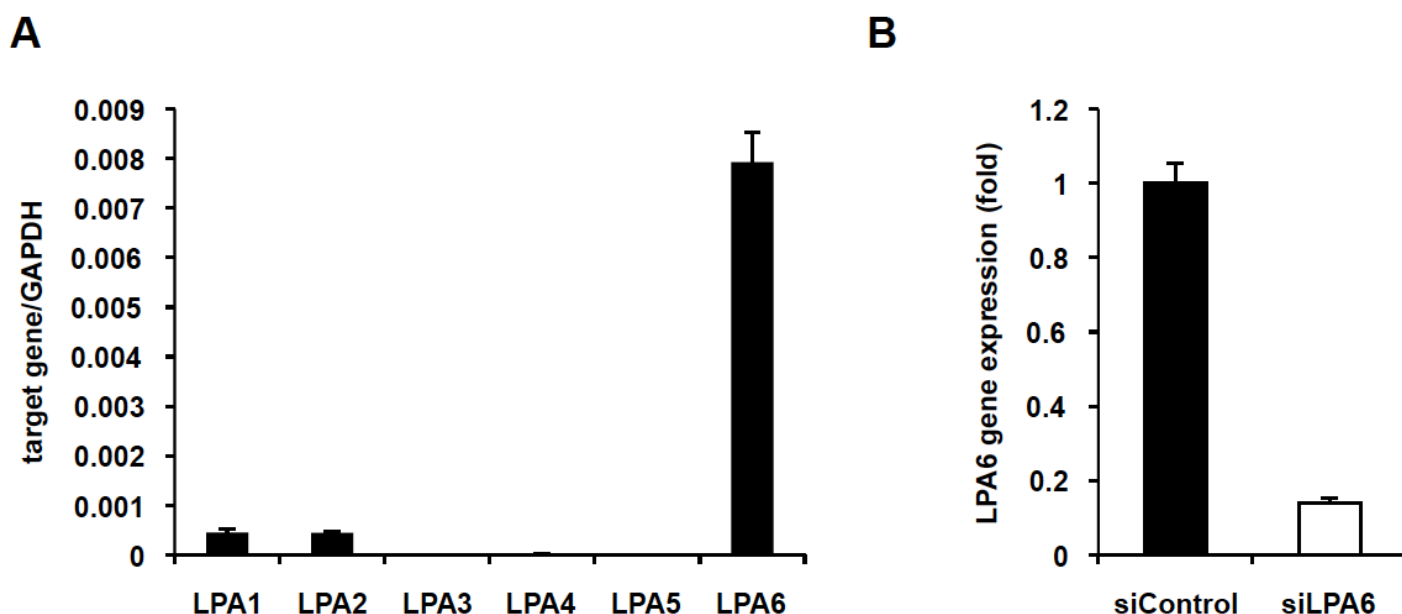


図 4-5, HUVECにおけるLPA受容体の発現とsiRNAによるノックダウン

A, HUVECのLPA受容体の発現量を定量RT-PCRを用いて調べた。GAPDHをハウスキーピング遺伝子とし、GAPDHの値で補正して表記している。HUVECではLPA₆の発現が高い。

B, LPA₆に対するsiRNAをHUVECに対してトランスフェクションし、二日後の遺伝子の発現量を定量RT-PCRを用いて調べた。siRNAを処理することにより、LPA₆の発現量が減少した。

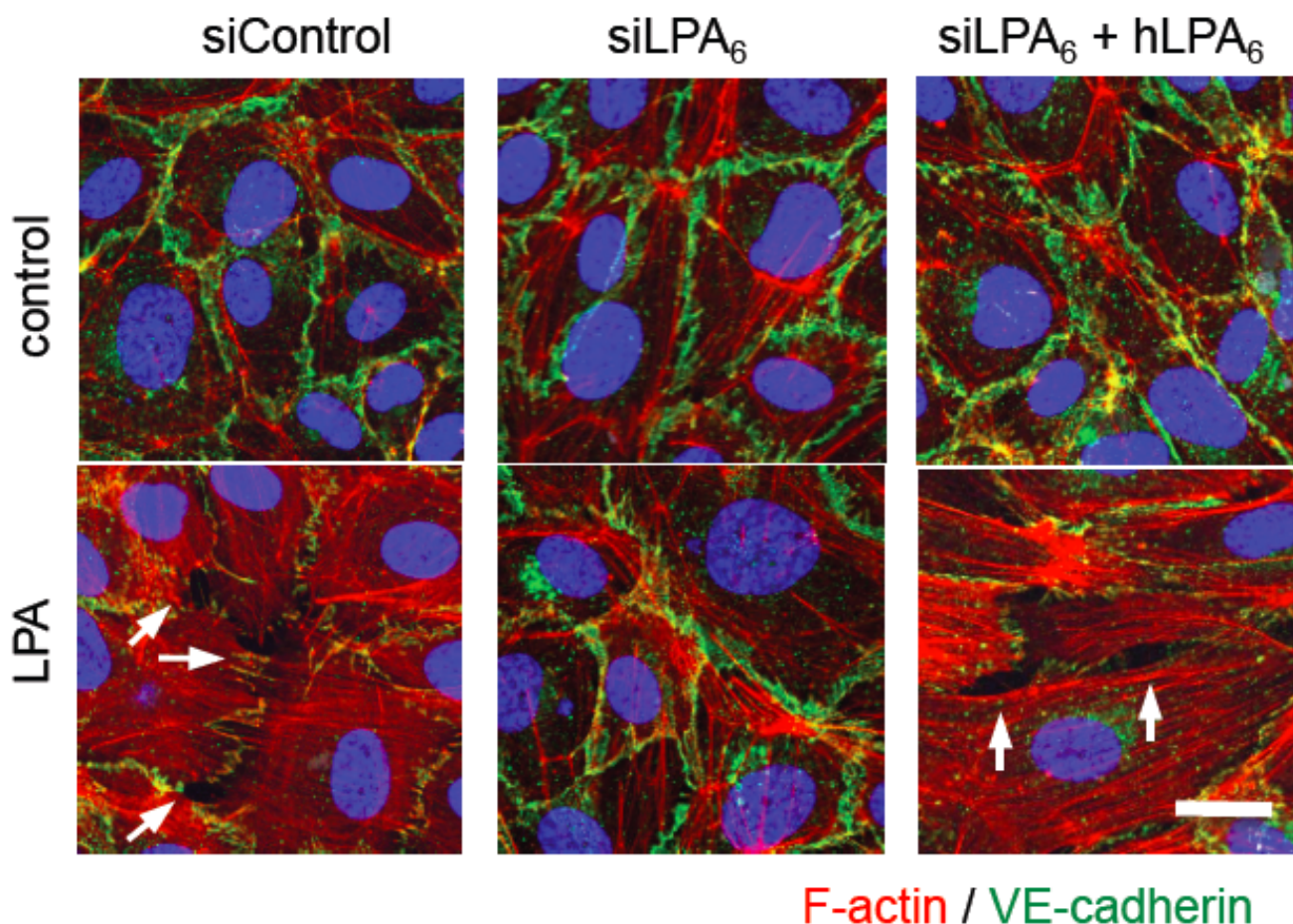


図 4-6, LPAはLPA₆を介してアクチンストレスファイバー形成が促進する。
 LPA刺激によりVE-cadherinの局在が変化し、細胞間にギャップができる(矢印)が、siRNAによりLPA₆をノックダウンするとLPAの効果が減弱する。siRNAと同時にsiRNA耐性のLPA₆ cDNAを導入することでレスキューされる。Scale bar : 20 μ m。

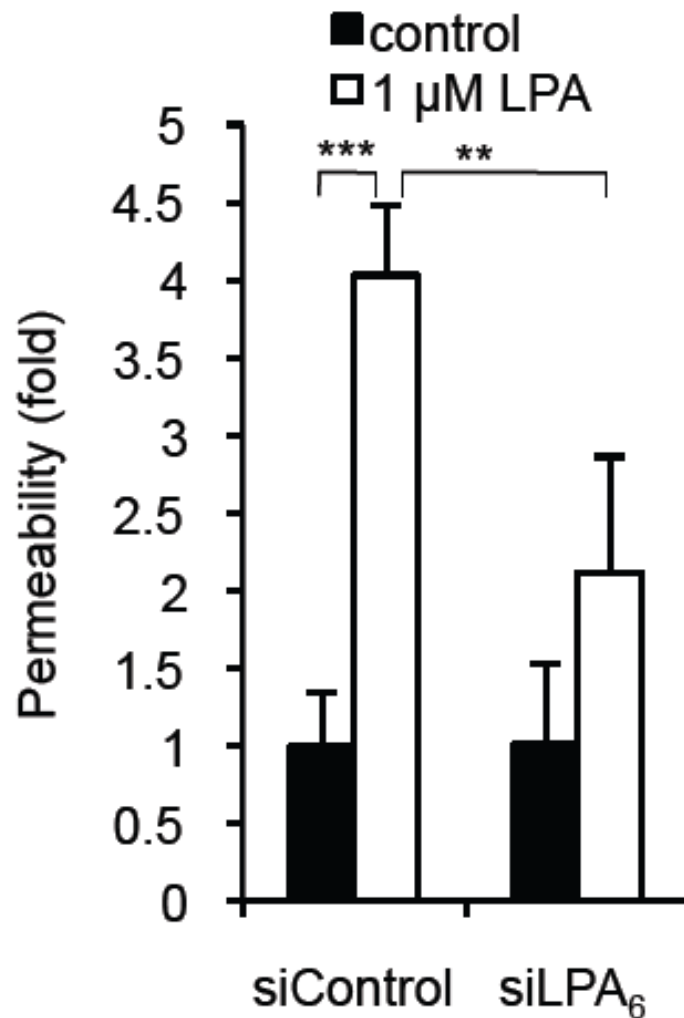


図 4-7, LPAによる血管透過性亢進作用はLPA₆を介する。

Transwellを用いた血管透過性アッセイ。LPA刺激により血管透過性が亢進するが、LPA₆をノックダウンするとLPAの作用が減弱する。 $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

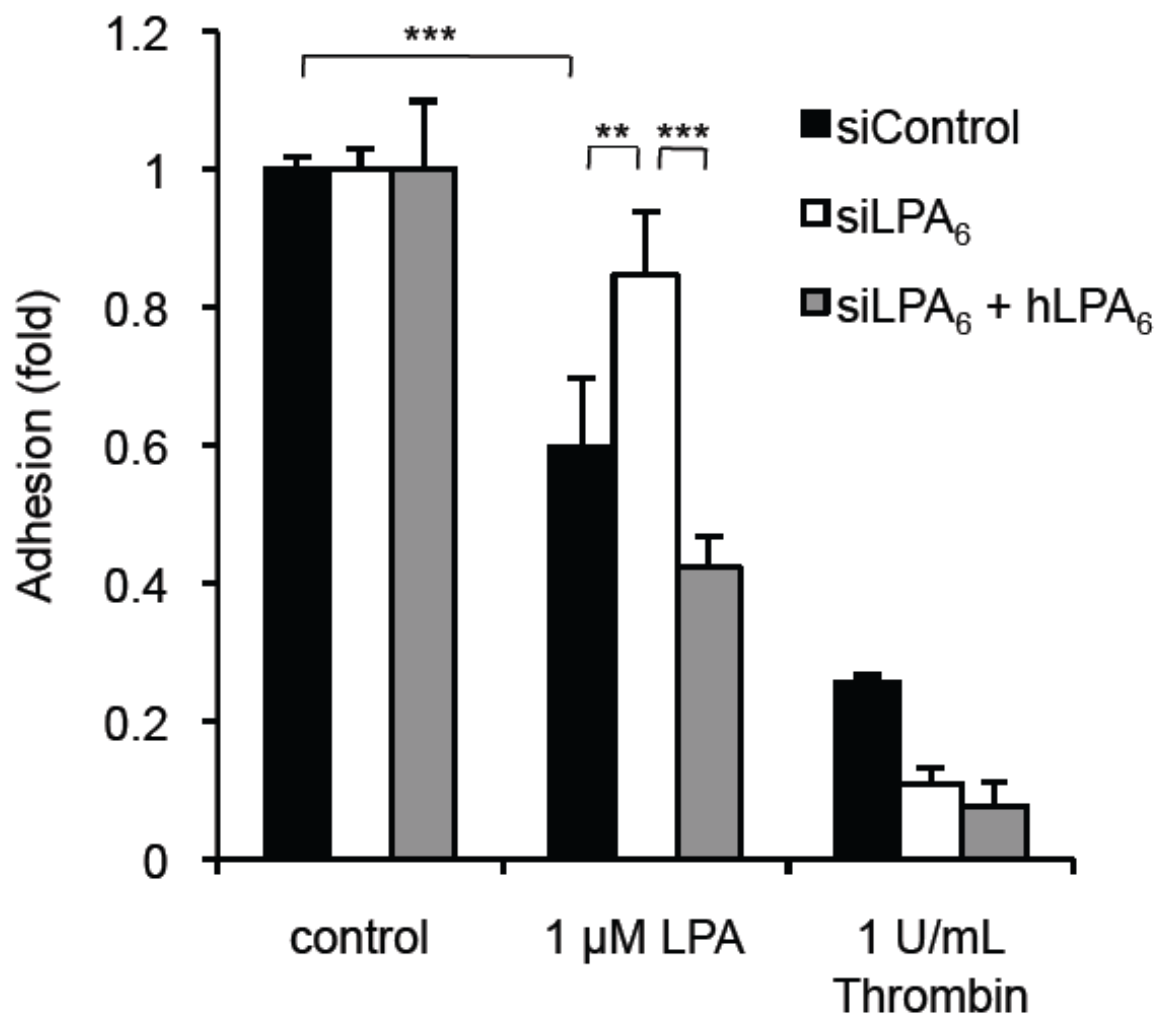


図 4-8, LPAによるVE-cadherin依存的な接着抑制作用はLPA₆を介する
 VE-cadherin接着アッセイ。LPA刺激によりVE-cadherin依存的な接着が抑制されるが、siRNAによりLPA₆をノックダウンするとLPAの効果が減弱する。siRNAと同時にsiRNA耐性のLPA₆ cDNAを導入することでレスキューされる。
 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

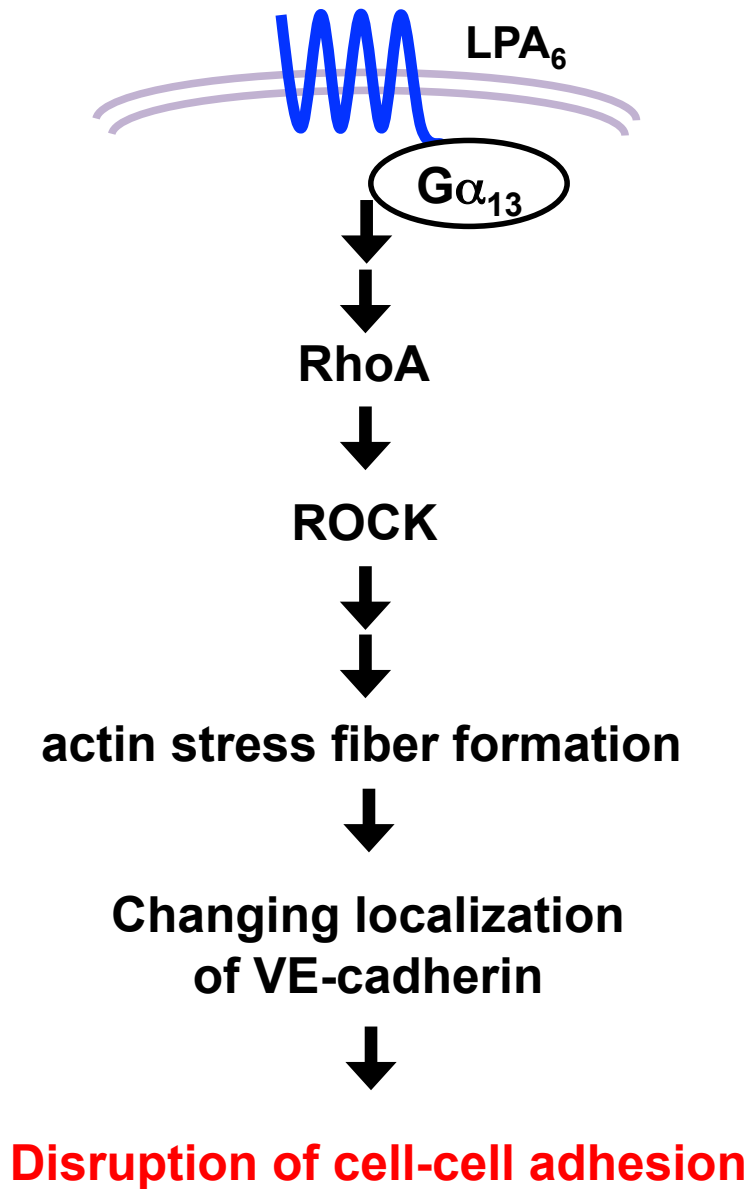


図 4-9, LPA₆の下流シグナル

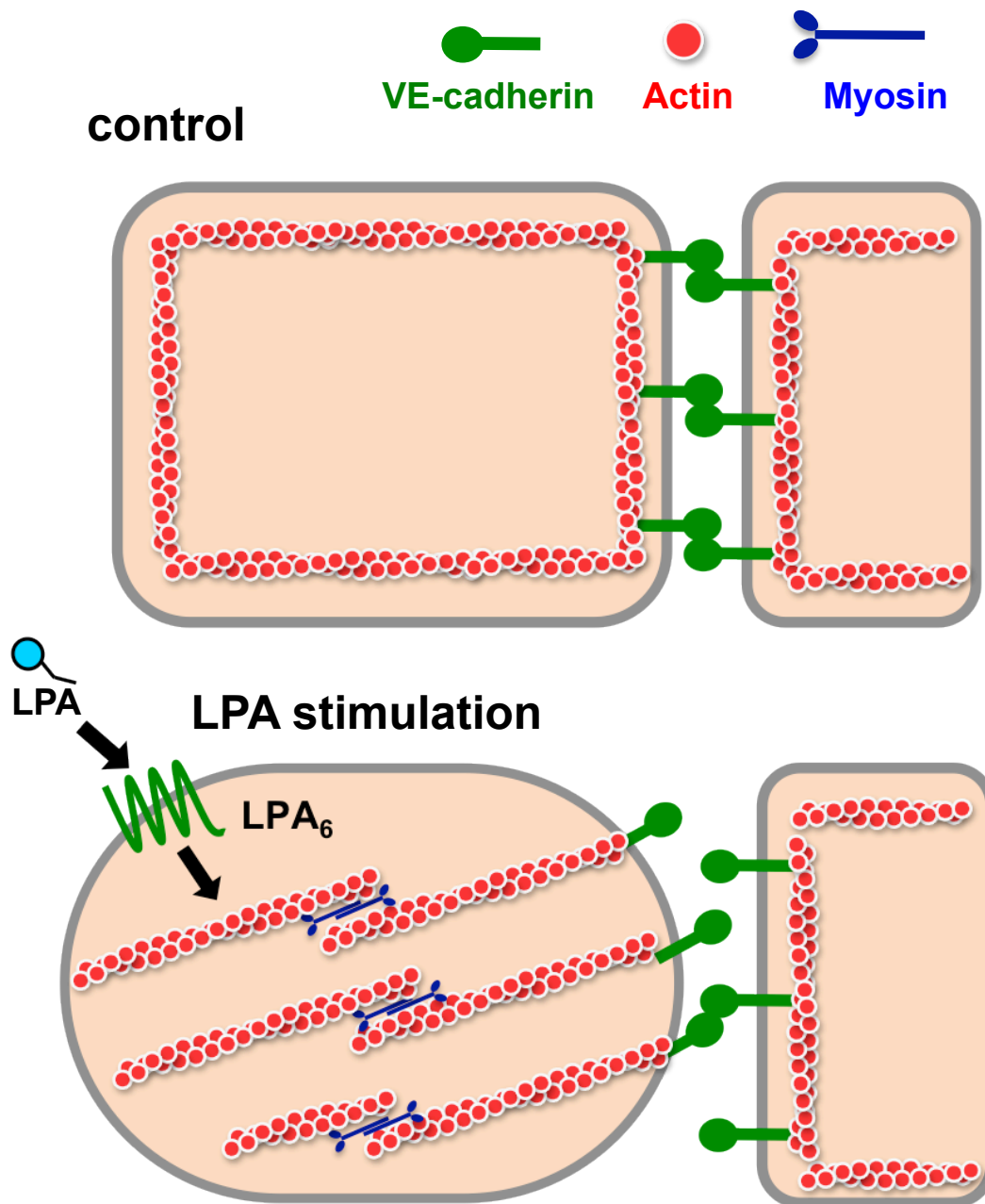


図 4-10, LPAによる細胞間接着抑制作用メカニズムの想定図

通常時、アクチン繊維が細胞接着面に沿って走っており、そのアクチンを足場としてVE-cadherin同士が強固に接着している。LPA刺激時には、細胞内を横断するようなアクチンストレスファイバーが形成され、結合しているVE-cadherinの局在が変化することで細胞間接着が抑制される。

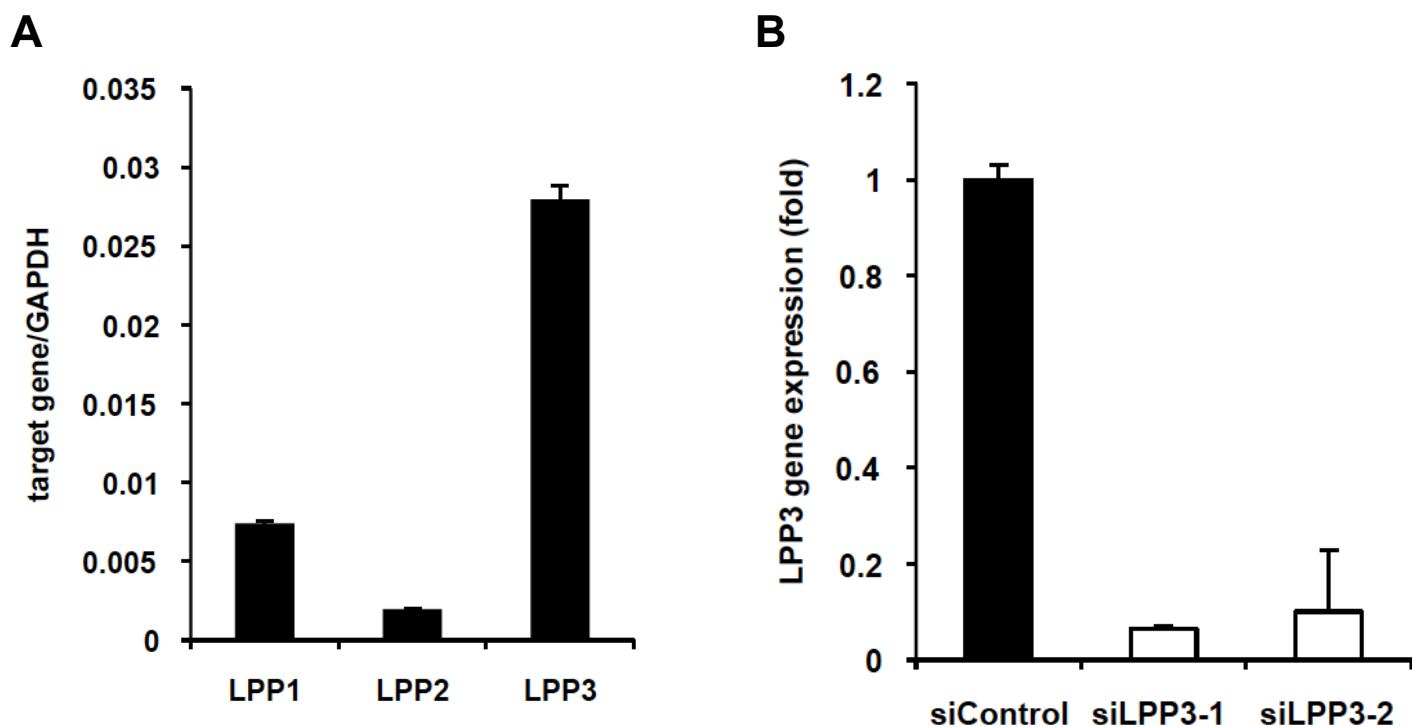


図 4-11, HUVECにおけるLPPの発現とsiRNAによるノックダウン

A, HUVECのLPPの発現量を定量RT-PCRを用いて調べた。GAPDHをハウスキーピング遺伝子とし、GAPDHの値で補正して表記している。HUVECではLPP3の発現が高い。

B, LPP3に対するsiRNAをHUVECに対してトランスフェクションし、二日後の遺伝子の発現量を定量RT-PCRを用いて調べた。siRNAを処理することにより、LPP3の発現量が減少した。

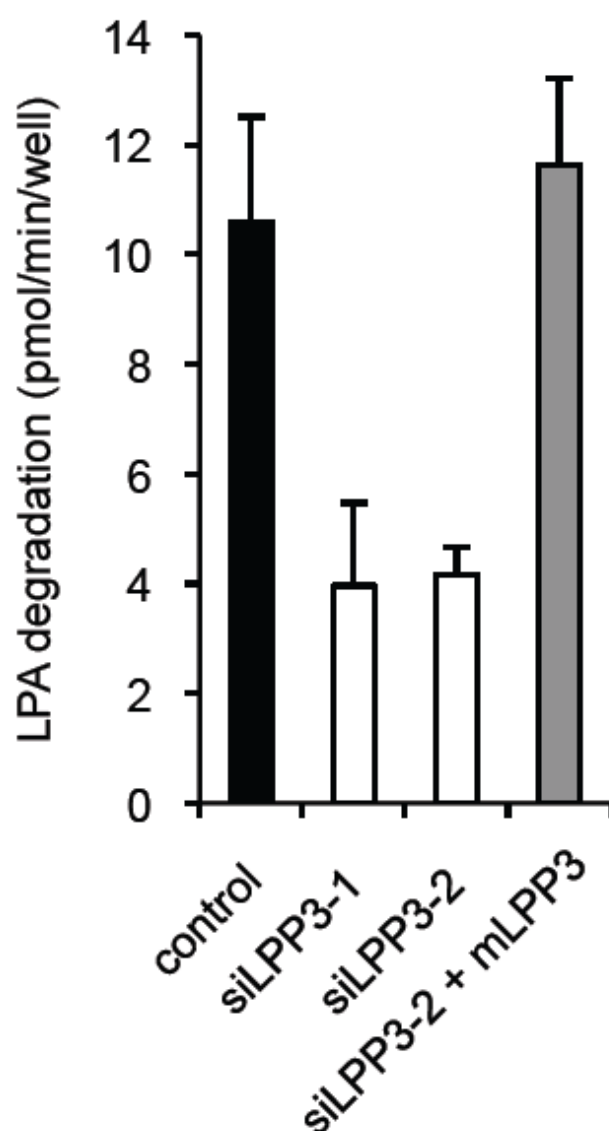


図 4-12, HUVECにおけるLPA分解活性測定

コンフルエントまで培養したHUVECの培養上清にLPAを加え、LPAの分解活性を測定した。LPP3をノックダウンするとHUVECのLPA分解活性が減少するが、mLPP3を導入することでLPA分解活性が回復する。

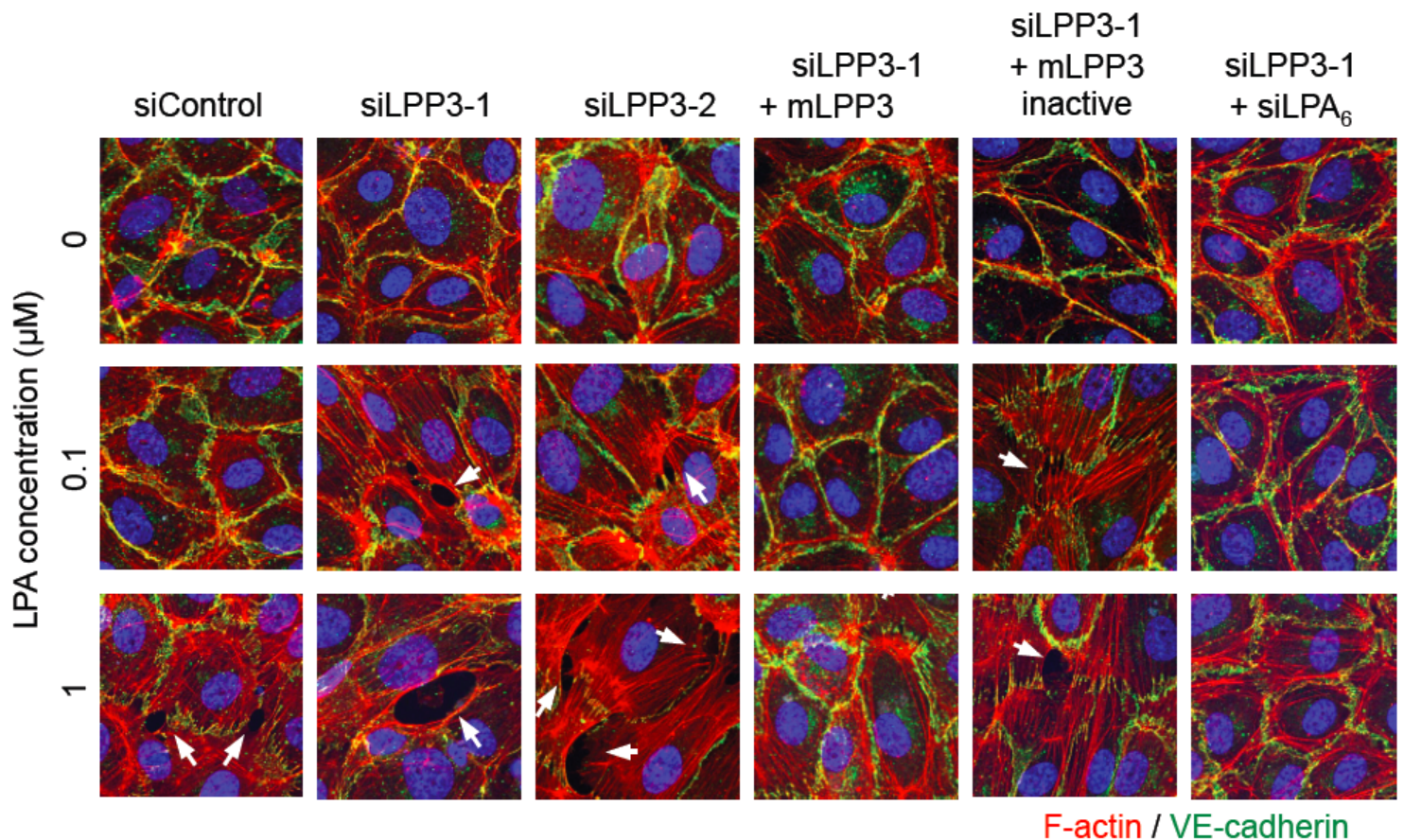


図 4-13, LPP3ノックダウンによりLPAへの感受性が高まる

通常時、0.1 μM LPA刺激では変化がなく、1 μM LPAによりVE-cadherinの局在が変化し、細胞間にギャップができる(矢印)が、siRNAによりLPP3をノックダウンすると0.1 μM LPAで効果が現れる。LPP3 siRNAと同時にmouse LPP3 (mLPP3) cDNAを導入することでレスキューされる。この効果はLPA分解活性がないmLPP3 (mLPP3 inactive) cDNAを導入しても見られない。さらにLPP3と同時にLPA₆をノックダウンすることでもレスキューされる。

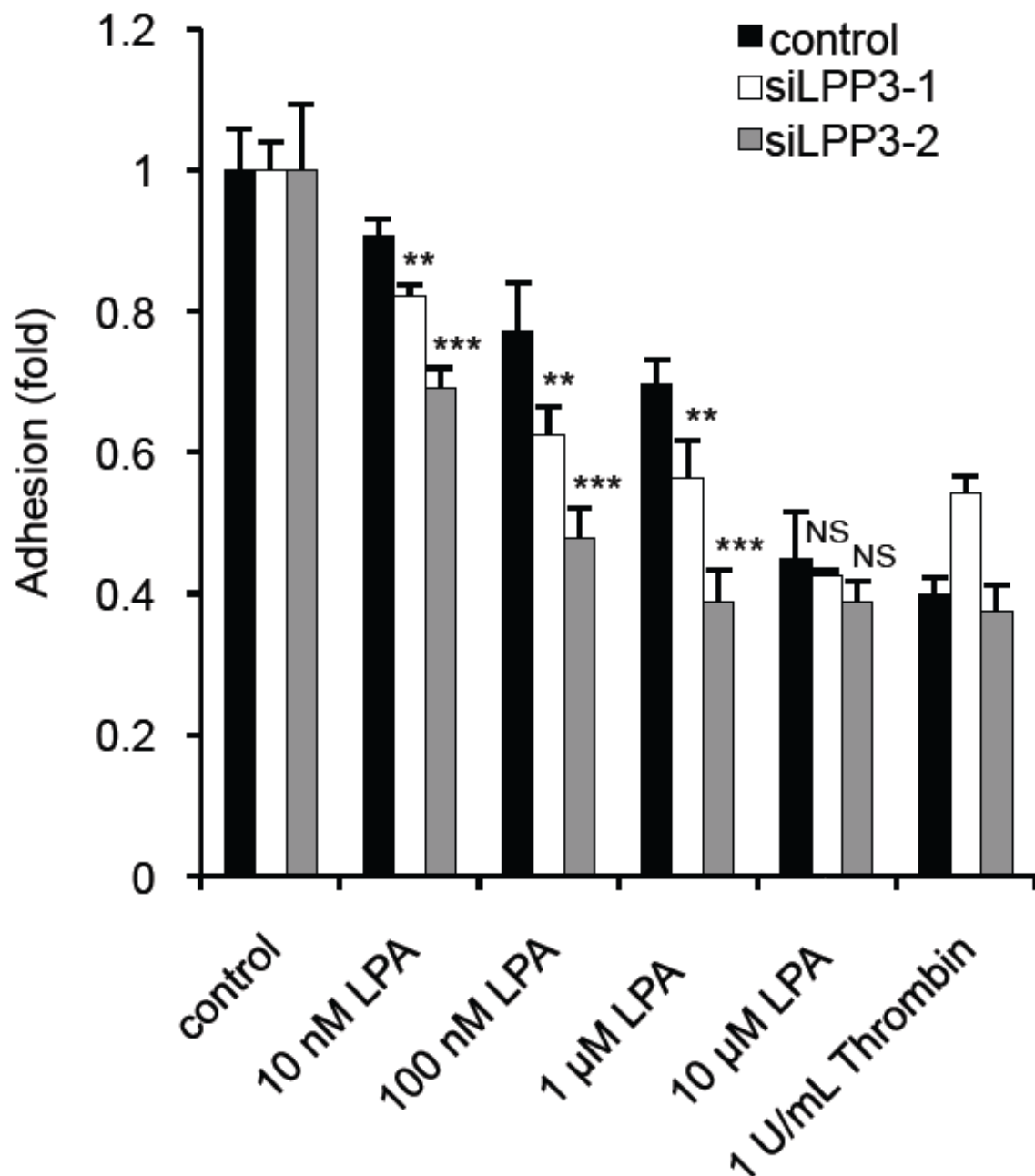
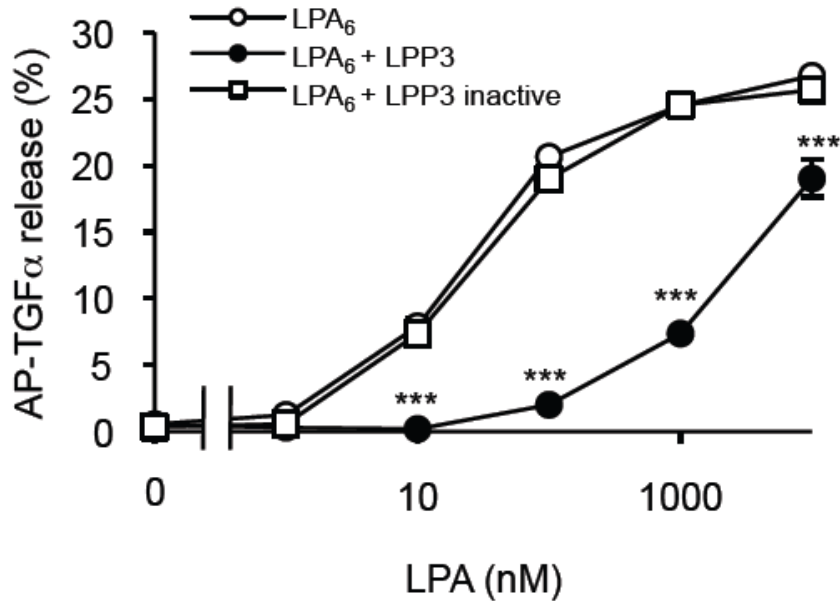


図 4-14, LPP3ノックダウンによりLPAによるVE-cadherin依存的な接着抑制作用が増強する

VE-cadherin接着アッセイ。LPA刺激によりVE-cadherin依存的な接着が抑制されるが、siRNAによりLPP3をノックダウンするとLPAの効果が増強する。

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A



B

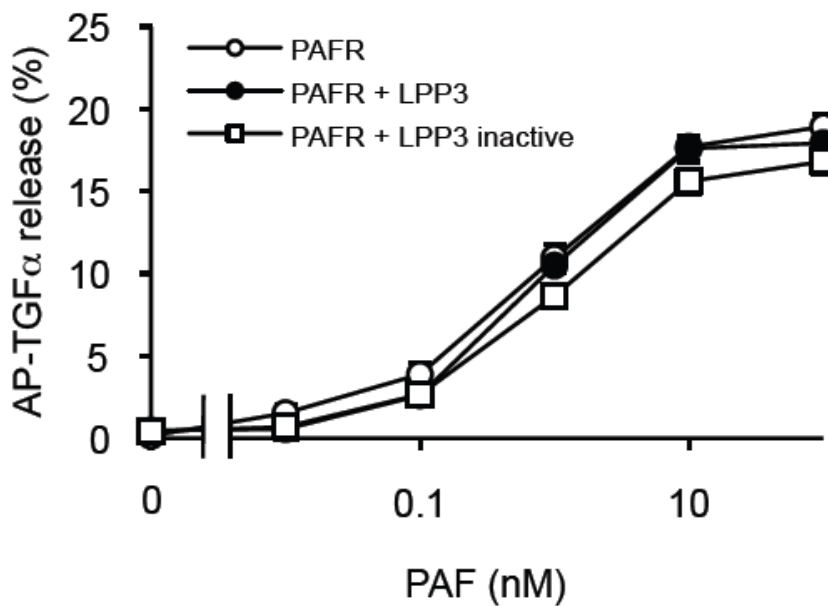


図 4-15, LPP3ノックダウンによりLPAによるVE-cadherin依存的な接着抑制作用が増強する

TGFα shedding アッセイ。

A, LPA濃度依存的にLPA₆が活性化されるが、LPP3を同時にトランスフェクションすると、LPAによる活性化が100倍程度低下するが、inactive体では変化がない。*** $P < 0.001$ 。

B, LPP3はPAFによるPAFRの活性化には影響を与えない。

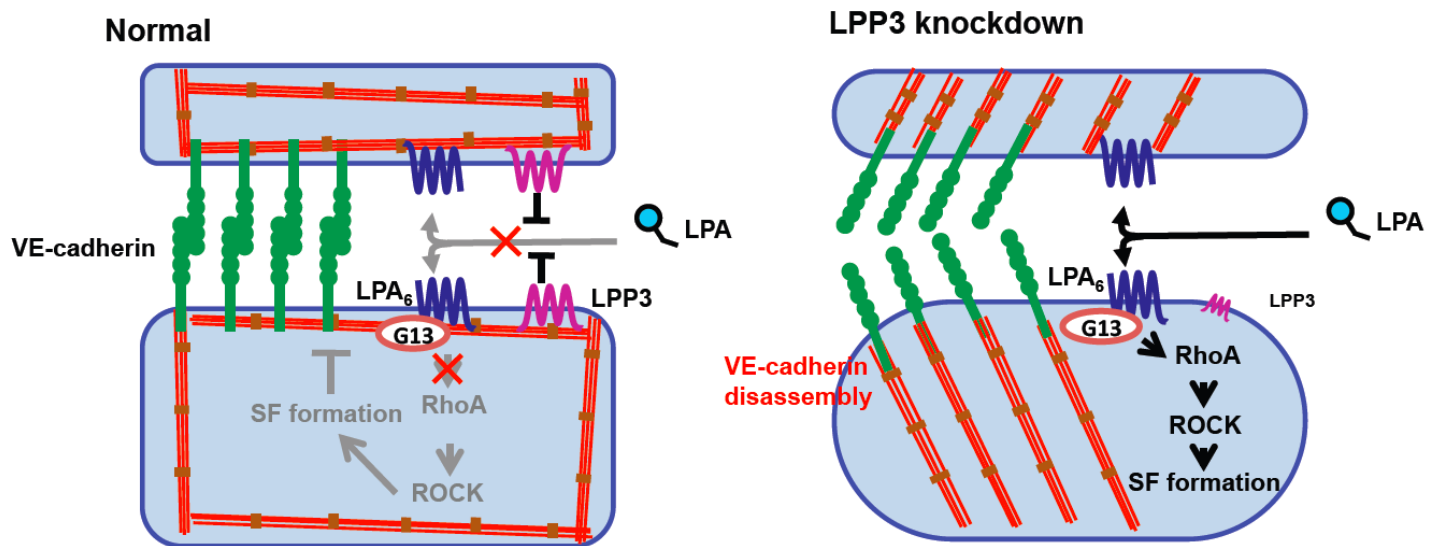


図 4-16, LPP3とLPA₆による細胞接着制御のモデル図

通常時LPP3はLPA₆へのシグナルを抑制することで、血管内皮細胞同士の接着を安定に保っているが、LPP3をノックダウンするとLPA₆が活性化しやすくなり、低濃度のLPAによって細胞間接着が弱まる。

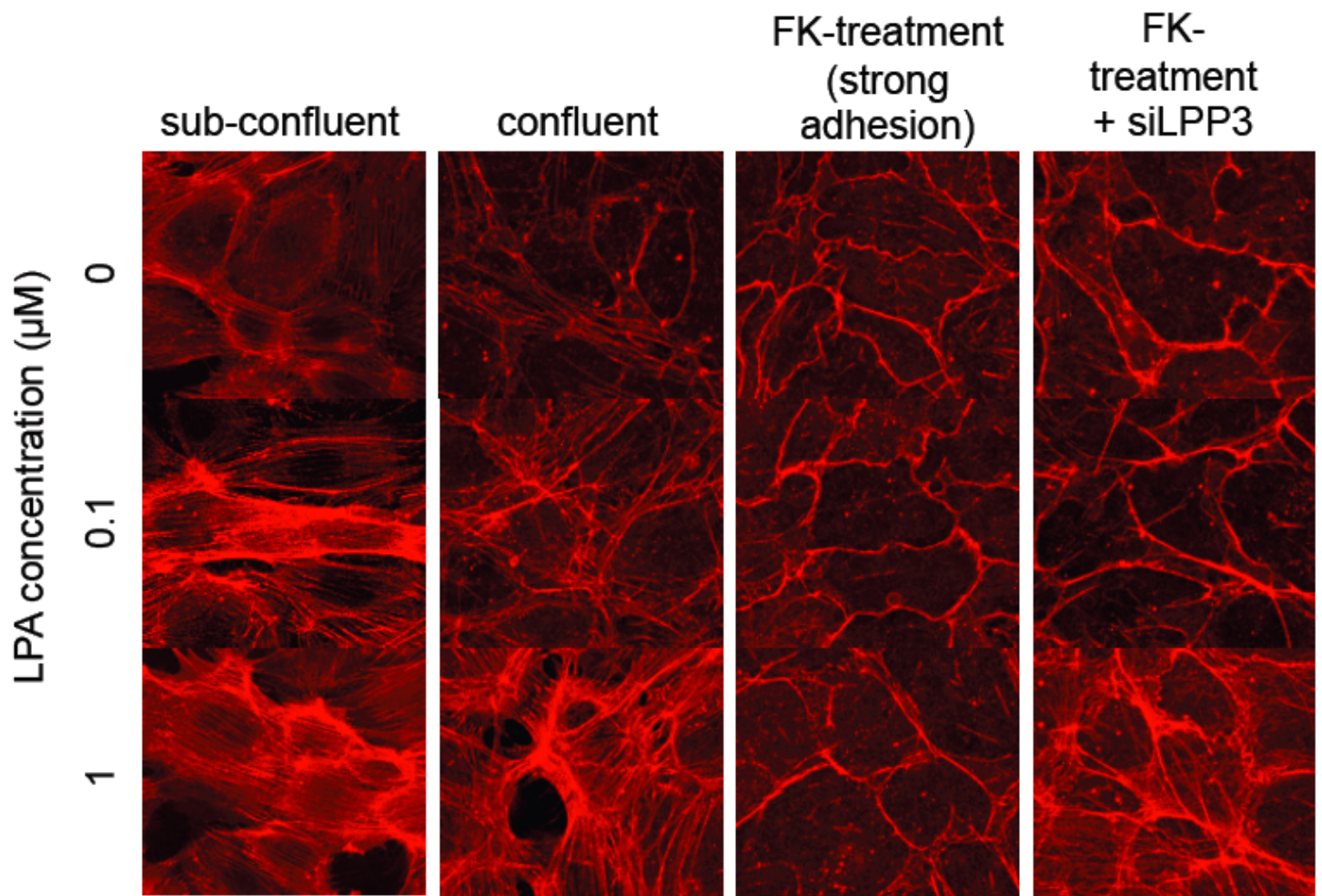


図 4-17, 細胞の接着の度合いによりLPAへの感受性が変化する

confluent 時には、0.1 μM LPA刺激では変化がなく、1 μM LPAによりアクチンストレスファイバー形成が促進されるが、sub-confluent時には0.1 μM LPAで効果が現れる。Forskolin (FK)処理し、細胞間接着を強めた際には1 μM LPAでも効果が見られなくなるが、LPP3をノックダウンすると一部アクチンストレスファイバーが形成されるようになる。

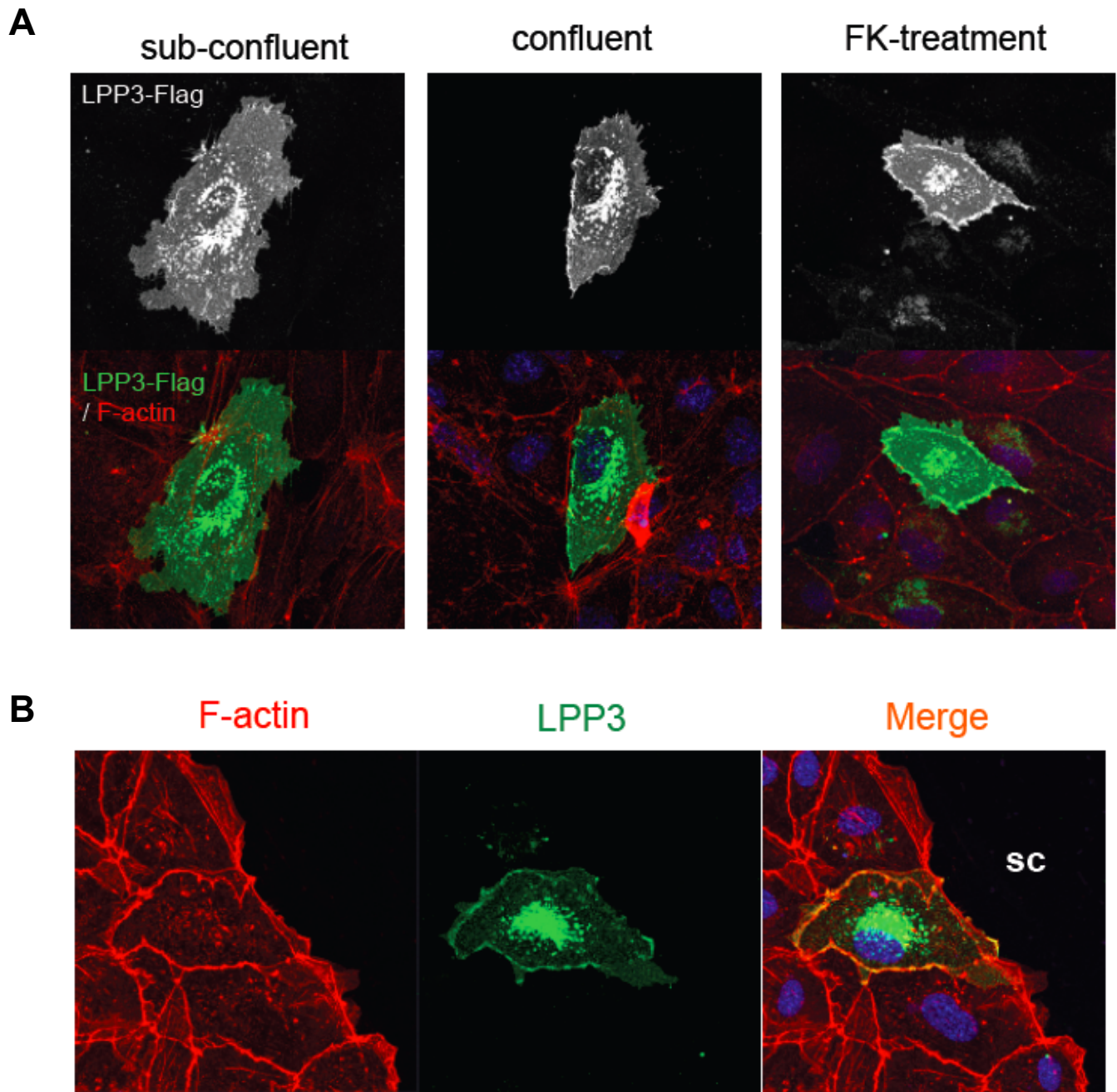


図 4-18, LPP3の細胞内局在

A, C末にFlagタグを付けたLPP3をHUVECにトランスフェクションし、LPP3の局在を観察した。sub-confluent, confluent, FK-treatment という条件で培養し、免疫蛍光染色を行った。

B, FK-treatment 後にチップを用いてHUVECのmonolayerをスクラッチし、その後、免疫蛍光染色によるLPP3を可視化した。LPP3 は主に細胞接着面に強く局在していた。sc: scratch area。

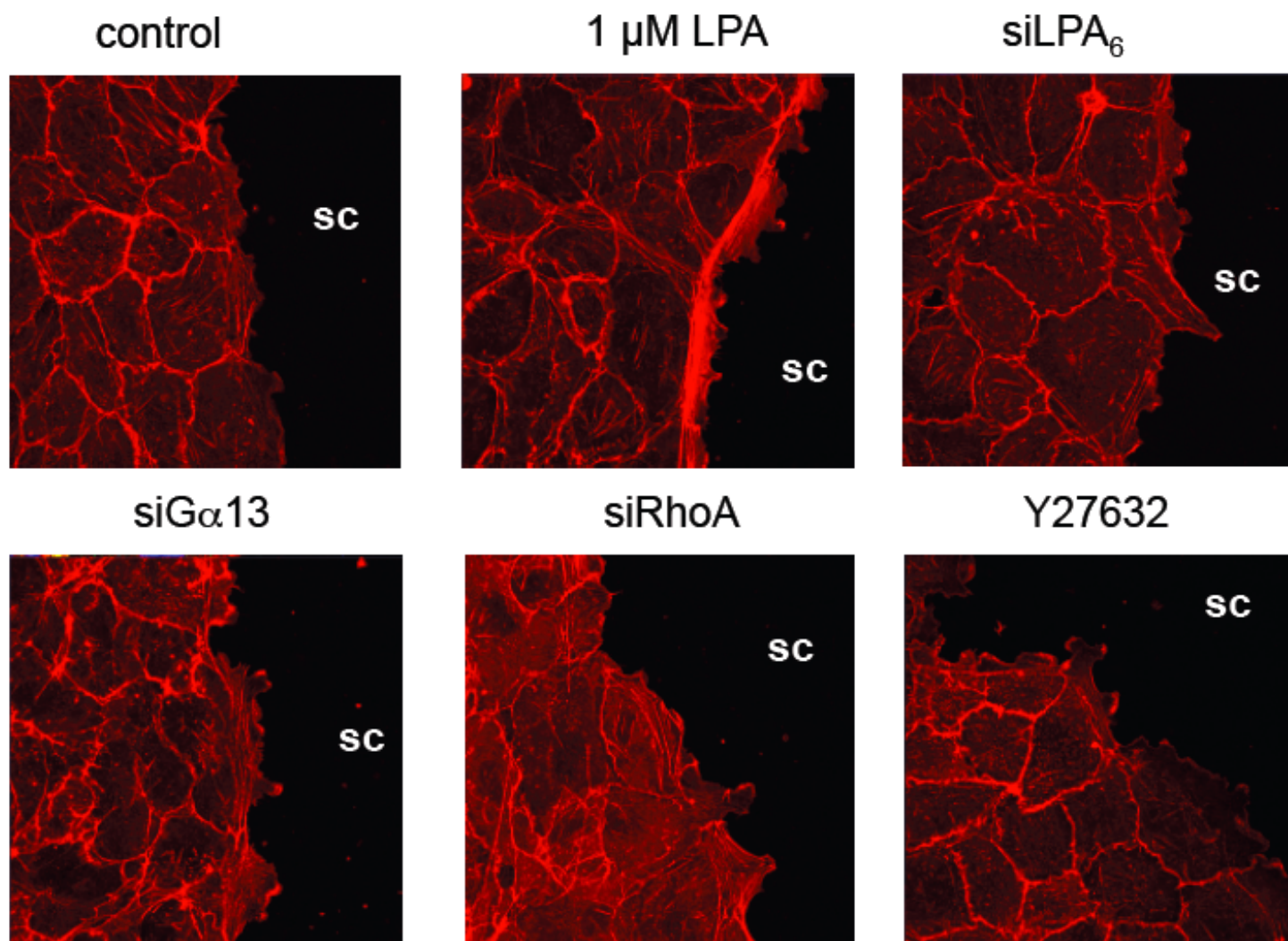


図 4-19, LPAは非細胞接着面でアクチンストレスファイバーを形成しやすい
 HUVECをコンフルエントまで培養後、FK処理し、チップでスクラッチした後LPA刺激を行った。LPA刺激により細胞の非接着面で強くアクチンストレスファイバーが形成された。細胞が接着している面ではほとんど変化がなかった。また、このLPAの作用はLPA₆/Gα₁₃/RhoA/ROCK 経路を介している。
 sc: scratch area。

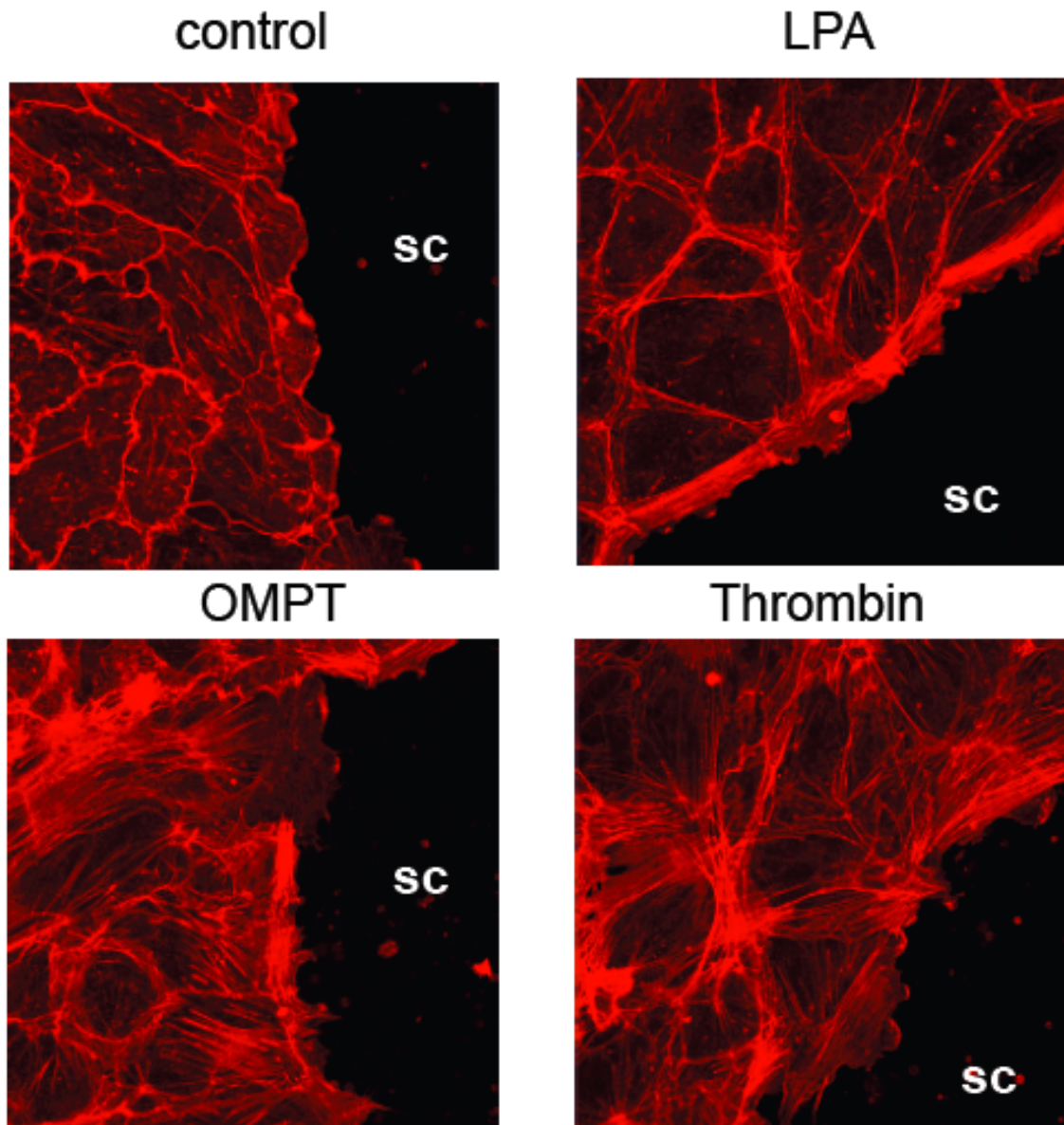


図 4-20, 局所的なアクチンストレスファイバー形成はLPA特異的なものである
 HUVECをコンフルエントまで培養後、FK処理し、チップでスクラッチした後LPA刺激を行った。LPA刺激により細胞の非接着面で強くアクチンストレスファイバーが形成されたが、LPP耐性のLPAアナログであるOMPTや $G\alpha_{13}$ を活性化することが知られている thrombin では細胞内全体でアクチンストレスファイバー形成が促進された。sc: scratch area。

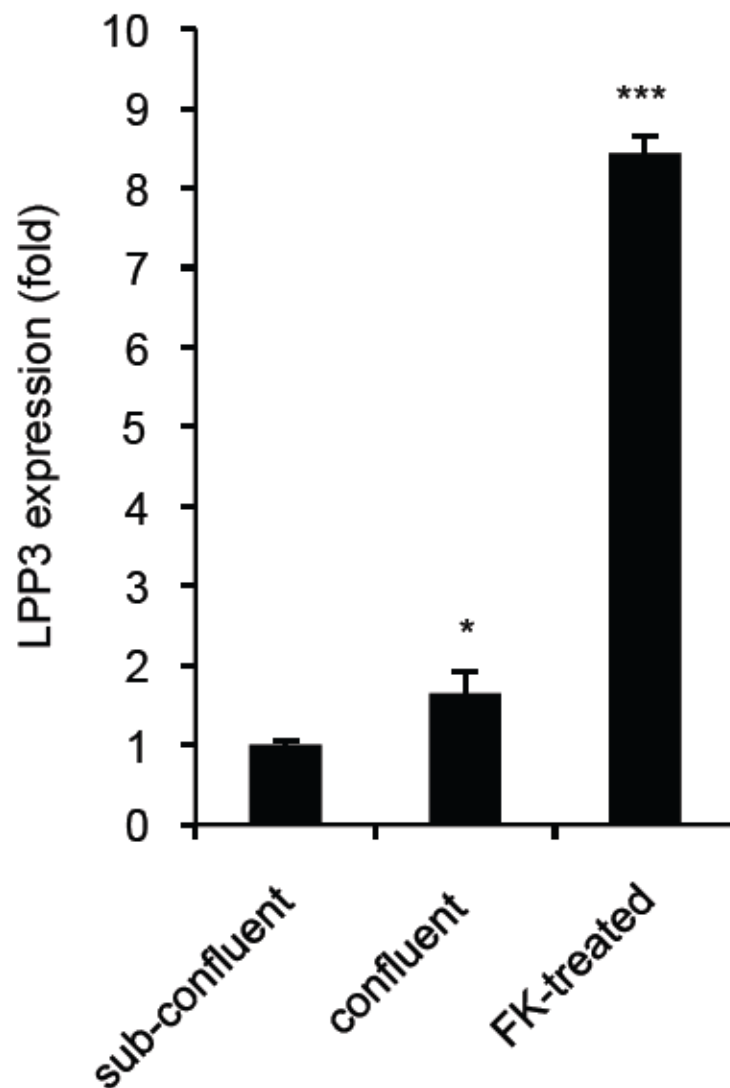


図 4-21, Forskolin (FK) 刺激によりLPP3の発現量が増加する

HUVEC を sub-confluent, confluent, FK-treatment という条件で培養した後、LPP3の遺伝子発現量を定量RT-PCRにより定量した。* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 。

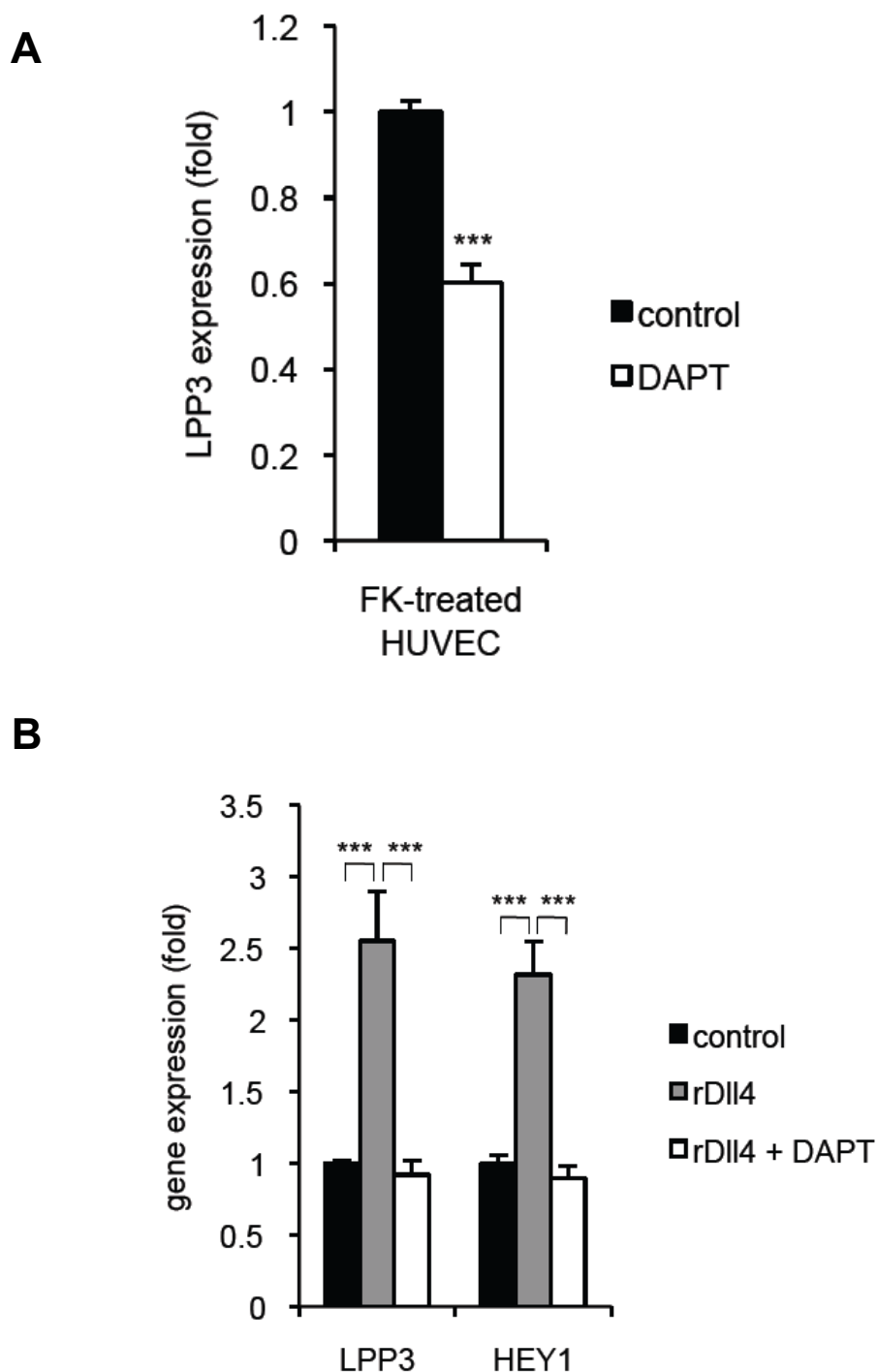
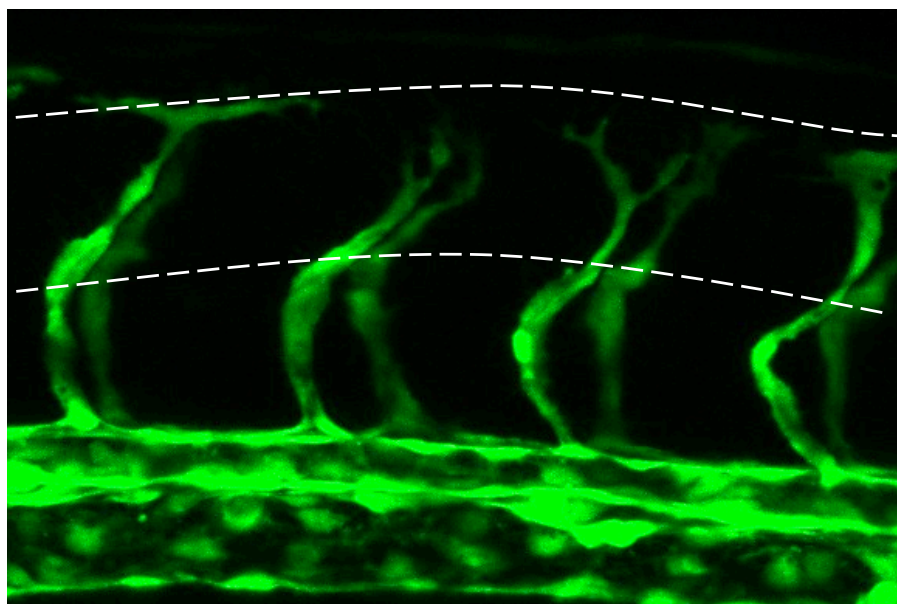


図 4-22, Notch signal によりLPP3の発現量が制御されている

A, FK処理したHUVEC をNotch inhibitorであるDAPTで処理した後、LPP3の遺伝子発現量を定量RT-PCRにより定量した。

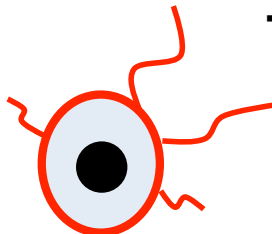
B, Notch ligand である recombinant DII4 (rDII4)でHUVECを刺激し、LPP3の発現量を定量した。DII4刺激によりLPP3の発現量が増加し、DAPT処理によりDII4の効果が無くなった。Notch target geneであるHEY1遺伝子をpositive controlとして使用した。*** $P < 0.001$ 。

受精後 30 時間



神経管

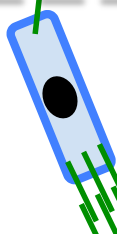
Tip cell



Tip cell の特徴

- ・長いフィロポディア(糸状仮足)を伸ばす。
- ・細胞遊走能が高い。
- ・ほとんど細胞増殖しない。

Stalk cell



Stalk cell の特徴

- ・細胞増殖する。
- ・管腔を形成する。
- ・強固なアドヘレンスジャンクションを形成する。

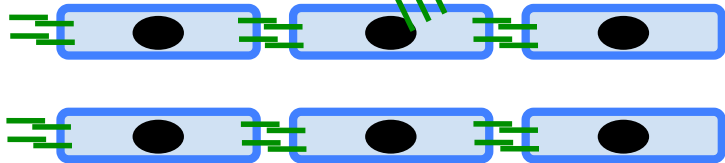


図 4-23, Tip cell と stalk cell

第五章：総括

第五章：総括

本研究で、私はゼブラフィッシュでも ATX-LPA シグナルは血管形成に重要であり、LPA が血管の伸長を促進させるということを明らかにした（第二章）。また LPP3 が LPA シグナルを調節することで血管形成を制御していることを示した（第三章）。さらに LPA の内皮細胞における機能を解析し、LPA が $\text{LPA}_6/\text{G}\alpha_{13}/\text{RhoA}/\text{ROCK}$ 経路を介してアクチンストレスファイバー形成を促進し、VE-cadherin による内皮細胞間接着を抑制するという知見を得た（第四章）。さらに LPP3 の発現量・発現部位が厳密に制御されており、LPA の作用する部位が限局されるということも明らかにした（第四章）。特に基質と産生酵素が細胞外に存在するために無制御に産生される LPA が、LPP3 によってその作用部位が厳密に制御されているというのは非常に興味深い知見であると考えている。第四章の考察で Tip cell と Stalk cell について説明したが、ATX ノックダウン時には先端の細胞の移動がおかしくなっていることから、Tip cell になにかしらの異常が生じていることが想定される（第二章）。また stalk cell は強固なアドヘレンスジャンクションを形成し、管腔を形成することが知られているが、LPP3 ノックダウン時には血管内皮細胞同士の結合が切れ、管腔もできていない様子が観察されていることから LPP3 ノックダウン時には stalk cell に異常が生じていることが考えられる（第三章）。こういった結果から通常時、Tip cell は血管の先端に存在するため細胞間接着面が少なく LPA が作用しやすくなっており、LPA は $\text{LPA}_{1,4,6}$ 受容体を介して血管伸長を促進していること、逆に stalk cell では Notch シグナルにより LPP3 の発現量が増加し LPA シグナルを抑制することで血管内皮細胞間の接着を維持し、適切な血管形成が行われていることを想定している（図 4-24）。

今回の研究では発生過程の血管形成における LPA シグナルの機能解析を行ってきた。しかし、発生過程以外にも創傷治癒や炎症、がんなどの病態時にも血管形成が関与していることから、LPA がこういった病態時にどのような機能を発揮するのか興味深い。これまでに ATX の高発現ががんの増殖浸潤、転移や薬剤抵抗性などに寄与することが報告されてきた(48,49)。また転移能の高いがん細胞では LPA を分解する活性が低くなっていることも報告されている(50)。今までの解析ではがん細胞により産生された ATX は LPA を産生し、その LPA はがん細胞自身に作用し、オートクライン的に作用すると考えられていた。しかし、LPA ががん細胞ではなく血管形成に作用することでがんの機能に影響を与える可能性も考えられる。実際にがんの増殖や転移にはがん組織内への血管形成は必須であり、血管新生阻害ががん治療の標的になっている(51)。LPA シグナルの経路を阻害すればがん細胞自身の機能を抑制し、さらに血管新生も抑制できることが考えられ、抗がん剤として魅力的なターゲットになるのではないかと考えられる。

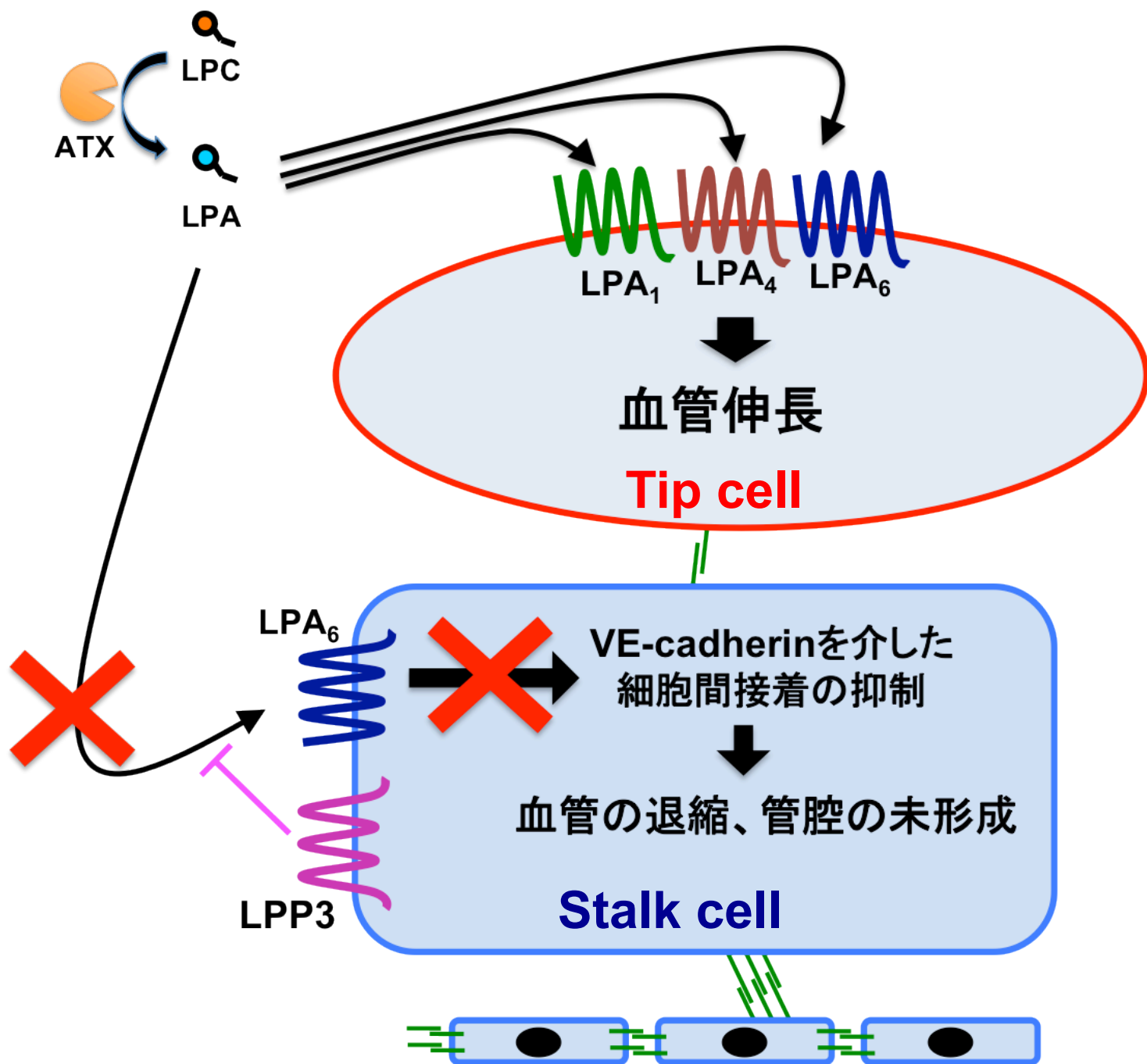


図 4-24, 産生酵素、受容体、分解酵素によるLPA制御機構のモデル図

ATXにより産生されたLPAは伸長している血管の先端に存在する tip cell に $LPA_{1,4,6}$ を介して作用し、血管の伸長を促進する。しかし、stalk cell ではLPP3 がLPAシグナルを抑制することで血管の接着を安定化している。

Reference

1. Tokumura, A., Fukuzawa, K., Akamatsu, Y., Yamada, S., Suzuki, T., and Tsukatani, H. (1978) *Lipids* **13**, 468-472
2. Hecht, J. H., Weiner, J. A., Post, S. R., and Chun, J. (1996) *J Cell Biol* **135**, 1071-1083
3. An, S., Bleu, T., Hallmark, O. G., and Goetzl, E. J. (1998) *J Biol Chem* **273**, 7906-7910
4. Bandoh, K., Aoki, J., Hosono, H., Kobayashi, S., Kobayashi, T., Murakami-Murofushi, K., Tsujimoto, M., Arai, H., and Inoue, K. (1999) *J Biol Chem* **274**, 27776-27785
5. Noguchi, K., Ishii, S., and Shimizu, T. (2003) *J Biol Chem* **278**, 25600-25606
6. Kotarsky, K., Boketoft, A., Bristulf, J., Nilsson, N. E., Norberg, A., Hansson, S., Owman, C., Sillard, R., Leeb-Lundberg, L. M., and Olde, B. (2006) *J Pharmacol Exp Ther* **318**, 619-628
7. Yanagida, K., Masago, K., Nakanishi, H., Kihara, Y., Hamano, F., Tajima, Y., Taguchi, R., Shimizu, T., and Ishii, S. (2009) *J Biol Chem* **284**, 17731-17741
8. Gerrard, J. M., Robinson, P., Narvey, M., and McNicol, A. (1993) *Biochem Cell Biol* **71**, 432-439
9. Eichholtz, T., Jalink, K., Fahrenfort, I., and Moolenaar, W. H. (1993) *Biochem J* **291** (Pt 3), 677-680
10. Aoki, J., Taira, A., Takanezawa, Y., Kishi, Y., Hama, K., Kishimoto, T., Mizuno, K., Saku, K., Taguchi, R., and Arai, H. (2002) *J Biol Chem*

277, 48737-48744

11. Tokumura, A., Harada, K., Fukuzawa, K., and Tsukatani, H. (1986) *Biochim Biophys Acta* **875**, 31-38
12. Tokumura, A., Miyake, M., Yoshimoto, O., Shimizu, M., and Fukuzawa, K. (1998) *Lipids* **33**, 1009-1015
13. Umezu-Goto, M., Kishi, Y., Taira, A., Hama, K., Dohmae, N., Takio, K., Yamori, T., Mills, G. B., Inoue, K., Aoki, J., and Arai, H. (2002) *J Cell Biol* **158**, 227-233
14. Stracke, M. L., Kruttsch, H. C., Unsworth, E. J., Arestad, A., Cioce, V., Schiffmann, E., and Liotta, L. A. (1992) *J Biol Chem* **267**, 2524-2529
15. Murata, J., Lee, H. Y., Clair, T., Kruttsch, H. C., Arestad, A. A., Sobel, M. E., Liotta, L. A., and Stracke, M. L. (1994) *J Biol Chem* **269**, 30479-30484
16. Lee, H. Y., Clair, T., Mulvaney, P. T., Woodhouse, E. C., Aznavoorian, S., Liotta, L. A., and Stracke, M. L. (1996) *J Biol Chem* **271**, 24408-24412
17. Lee, H. Y., Murata, J., Clair, T., Polymeropoulos, M. H., Torres, R., Manrow, R. E., Liotta, L. A., and Stracke, M. L. (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **218**, 714-719
18. Tanaka, M., Kishi, Y., Takanezawa, Y., Kakehi, Y., Aoki, J., and Arai, H. (2004) *FEBS Lett* **571**, 197-204
19. Bachner, D., Ahrens, M., Betat, N., Schroder, D., and Gross, G. (1999) *Mech Dev* **84**, 121-125
20. Garciadiego-Cazares, D., Rosales, C., Katoh, M., and Chimal-Monroy, J. (2004) *Development* **131**, 4735-4742

21. Mori, K., Kitayama, J., Aoki, J., Kishi, Y., Shida, D., Yamashita, H., Arai, H., and Nagawa, H. (2007) *Virchows Arch* **451**, 47-56
22. Nakamura, K., Igarashi, K., Ide, K., Ohkawa, R., Okubo, S., Yokota, H., Masuda, A., Oshima, N., Takeuchi, T., Nangaku, M., Okudaira, S., Arai, H., Ikeda, H., Aoki, J., and Yatomi, Y. (2008) *Clin Chim Acta* **388**, 51-58
23. Masuda, A., Nakamura, K., Izutsu, K., Igarashi, K., Ohkawa, R., Jona, M., Higashi, K., Yokota, H., Okudaira, S., Kishimoto, T., Watanabe, T., Koike, Y., Ikeda, H., Kozai, Y., Kurokawa, M., Aoki, J., and Yatomi, Y. (2008) *Br J Haematol* **143**, 60-70
24. Masuda, A., Fujii, T., Iwasawa, Y., Nakamura, K., Ohkawa, R., Igarashi, K., Okudaira, S., Ikeda, H., Kozuma, S., Aoki, J., and Yatomi, Y. (2011) *Clin Chim Acta* **412**, 1944-1950
25. Tanaka, M., Okudaira, S., Kishi, Y., Ohkawa, R., Iseki, S., Ota, M., Noji, S., Yatomi, Y., Aoki, J., and Arai, H. (2006) *J Biol Chem* **281**, 25822-25830
26. Ferry, G., Giganti, A., Cogé, F., Bertaux, F., Thiam, K., and Boutin, J. A. (2007) *FEBS Lett* **581**, 3572-3578
27. Nakanaga, K., Hama, K., and Aoki, J. (2010) *J Biochem* **148**, 13-24
28. Nam, S. W., Clair, T., Kim, Y. S., McMarlin, A., Schiffmann, E., Liotta, L. A., and Stracke, M. L. (2001) *Cancer Res* **61**, 6938-6944
29. Sumida, H., Noguchi, K., Kihara, Y., Abe, M., Yanagida, K., Hamano, F., Sato, S., Tamaki, K., Morishita, Y., Kano, M. R., Iwata, C., Miyazono, K., Sakimura, K., Shimizu, T., and Ishii, S. (2010) *Blood* **116**, 5060-5070

30. Thisse, C., and Thisse, B. (2008) *Nat Protoc* **3**, 59-69
31. Ptaszynska, M. M., Pendrak, M. L., Stracke, M. L., and Roberts, D. D. (2010) *Mol Cancer Res* **8**, 309-321
32. Lee, S. J., Chan, T. H., Chen, T. C., Liao, B. K., Hwang, P. P., and Lee, H. (2008) *FASEB J* **22**, 3706-3715
33. Ren, Y., Guo, L., Tang, X., Apparsundaram, S., Kitson, C., Deguzman, J., Fuentes, M. E., Coyle, L., Majmudar, R., Allard, J., Truitt, T., Hamid, R., Chen, Y., Qian, Y., and Budd, D. C. (2013) *Microvasc Res* **85**, 59-67
34. Fotopoulou, S., Oikonomou, N., Grigorieva, E., Nikitopoulou, I., Paparountas, T., Thanassopoulou, A., Zhao, Z., Xu, Y., Kontoyiannis, D. L., Remboutsika, E., and Aidinis, V. (2010) *Dev Biol* **339**, 451-464
35. Pyne, S., Long, J. S., Ktistakis, N. T., and Pyne, N. J. (2005) *Biochem Soc Trans* **33**, 1370-1374
36. Tomsig, J. L., Snyder, A. H., Berdyshev, E. V., Skobeleva, A., Mataya, C., Natarajan, V., Brindley, D. N., and Lynch, K. R. (2009) *Biochem J* **419**, 611-618
37. Zhang, N., Sundberg, J. P., and Gridley, T. (2000) *Genesis* **27**, 137-140
38. Escalante-Alcalde, D., Hernandez, L., Le Stunff, H., Maeda, R., Lee, H. S., Jr Gang, C., Sciorra, V. A., Daar, I., Spiegel, S., Morris, A. J., and Stewart, C. L. (2003) *Development* **130**, 4623-4637
39. Gory-Faure, S., Prandini, M. H., Pointu, H., Roullot, V., Pignot-Paintrand, I., Vernet, M., and Huber, P. (1999) *Development* **126**, 2093-2102
40. Sanchez, T., Skoura, A., Wu, M. T., Casserly, B., Harrington, E. O.,

- and Hla, T. (2007) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 1312-1318
41. Lee, H., Lin, C. I., Liao, J. J., Lee, Y. W., Yang, H. Y., Lee, C. Y., Hsu, H. Y., and Wu, H. L. (2004) *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C1657-1666
 42. Fukuhara, S., Sakurai, A., Sano, H., Yamagishi, A., Somekawa, S., Takakura, N., Saito, Y., Kangawa, K., and Mochizuki, N. (2005) *Mol Cell Biol* **25**, 136-146
 43. Inoue, A., Ishiguro, J., Kitamura, H., Arima, N., Okutani, M., Shuto, A., Higashiyama, S., Ohwada, T., Arai, H., Makide, K., and Aoki, J. (2012) *Nat Methods* **9**, 1021-1029
 44. Birukova, A. A., Smurova, K., Birukov, K. G., Kaibuchi, K., Garcia, J. G., and Verin, A. D. (2004) *Microvasc Res* **67**, 64-77
 45. Moy, A. B., Bodmer, J. E., Blackwell, K., Shasby, S., and Shasby, D. M. (1998) *Am J Physiol* **274**, L1024-1029
 46. Jiang, G., Inoue, A., Aoki, J., and Prestwich, G. D. (2013) *Bioorg Med Chem Lett* **23**, 1865-1869
 47. Phng, L. K., and Gerhardt, H. (2009) *Dev Cell* **16**, 196-208
 48. Houben, A. J., and Moolenaar, W. H. (2011) *Cancer Metastasis Rev* **30**, 557-565
 49. Brindley, D. N., Lin, F. T., and Tigyi, G. J. (2013) *Biochim Biophys Acta* **1831**, 74-85
 50. Samadi, N., Bekele, R., Capatos, D., Venkatraman, G., Sariahmetoglu, M., and Brindley, D. N. (2011) *Biochimie* **93**, 61-70
 51. Shojaei, F. (2012) *Cancer Lett* **320**, 130-137

発表論文

Yukiura, H., Hama, K., Nakanaga, K., Tanaka, M., Asaoka, Y., Okudaira, S.,
Arima, N., Inoue, A., Hashimoto, T., Arai, H., Kawahara, A., Nishina, H.,
and Aoki, J. (2011) *J Biol Chem* **286**, 43972-43983

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導頂いた東北大学大学院薬学研究科分子細胞生化学教室の青木淳賢 教授、巻出久美子 助教、井上飛鳥 助教、可野邦行 助教に深く感謝します。特に青木 教授からは研究者としての考え方や実験に取り組む姿勢を教えていただき深く感謝いたします。また帝京大学 濱弘太郎 講師にはゼブラフィッシュに関する実験に関して、丁寧に指導していただき、感謝いたします。

マウスの飼育にあたり、いつも影で支えてくださった動物者のスタッフの方々に感謝いたします。

研究生活を共にし、本研究を様々な面で支えてくださいました分子細胞生化学教室のスタッフ・学生の皆様に深く感謝いたします。また同期である石黒純修士、奥谷倫世 学士とはお互いに励まし合い、切磋琢磨しながら研究室生活を送ることができたことをうれしく思い、感謝いたします。

最後になりますが、いつも応援し、暖かく見守ってくれた母、兄、そして今は亡き父に深く感謝します。

ありがとうございました。

平成 27 年 1 月 14 日